N° d'ordre : 93

THESES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE D'AIX-MARSEILLE

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Aimé CREVAT
Licencié es sciences physiques

PREMIÈRE THÈSE

Sur la dissimulation des ions Sodium et Potassium par les esters amides polyphosphoriques de la Thiamine

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

Soutenues le 28 juin 1961 devant la Commission d'examen

E. CALVET — Président
G. CARPENI
J. METZGER — Examinateurs
H. ROUX

Imprimerie ROBERT
24, rue Moustier
MARSEILLE

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547028_0049

N° d'ordre : 93

THESES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE D'AIX-MARSEILLE

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Aimé CREVAT
Licencié es sciences physiques

PREMIÈRE THÈSE

Sur la dissimulation des ions Sodium et Potassium par les esters amides polyphosphoriques de la Thiamine

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

Soutenues le 28 juin 1961 devant la Commission d'examen

E. CALVET	Président
G. CARPENI	Examinateurs
J. METZGER	
H. ROUX	

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Sur la dissimulation des ions Sodium et Potassium par les esters amides polyphosphoriques de la Thiamine

UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE
FACULTÉ DES SCIENCES DE MARSEILLE

Mort au Champ d'Honneur, M. F. MARTY,
Maître de conférences de mathématiques
(14 juin 1940)

Doyens honoraires : MM. MARCHAUD, TRAYNARD, CORROY, CHOUX.

Professeurs honoraires : MM. J. MARCHAUD, E. TRAYNARD, J. PERES, G. PETIT, R. THIRY, J. BOSLER, A. TIAN, L. MARGAILLAN, P. BENOIT, H. CABANNES.

Doyen : M. P. ROUARD. *Assesseur :* A. GUILLEMONAT.

Secrétaire principal : M. C. MOYNAULT.

PROFESSEURS

MM.	G. CORROY	Géologie et Minéralogie
	P. CHOUX	Botanique
	R. CERIGHELLI	Agronomie tropicale
	J. VALENSI	Mécanique expérimentale des fluides
	P. ROUARD	Physique générale
	H. PRAT	Botanique
	P. DESNUELLE	Chimie biologique
	N. ABELOOS	Biologie générale
	R. MERIGOUX	Physique industrielle
	P. VINCENSINI	Calcul différentiel et intégral
	E. CALVET	Chimie générale
	C. FEHRENBACH	Astronomie
	A. FAVRE	Mécanique de l'atmosphère
	A. GUILLEMONAT	Chimie industrielle
	J.-M. PERES	Océanographie biologique
	G. CARPENI	Chimie M.P.C.
	C. JAUSSERAN	Physique M.P.C.
	R. MOLINIER	Biologie végétale
	Y. DOUCET	Physique M.P.C.
	J.-M. SOURIAU	Méthodes mathémat. de la physique
	P. COTTON	Electronique
	J. METZGER	Chimie S.P.C.N.
	J. TIMON-DAVID	Zoologie
	L. FOURES	Mathématiques
	D. MALÉ	Physique
	G. BODIOU	Mathématiques appliquées
	M. NAUDET	Chimie des corps gras
	F. NAHON	Mathématiques
	J. PAILLARD	Psycho-physiologie
	L. SAVIDAN	Chimie systématique
	D. KASTLER	Physique théorique
	P. BOUSQUET	Physique S.P.C.N.
	P. PESTEIL	Physique P.C.B.
	G. LIANDRAT	Physique (Institut de Nice)
	P. CASAL	Mécanique rationnelle et appliquée

Professeurs sans chaire

MM. GOUVERNET C.	Géologie appliquée
C. CLARION (Mlle)	Mécanique des fluides
R. AMAR	Biologie animale P.C.B.
A. JULG	Chimie théorique
S. WACHS	Mathématiques gén. (Institut de Nice)
J. CHOUTEAU	Physiologie animale
A. VISCONTI	Physique théorique
J. LEFEBVRE	Chimie M.P.C.
L. DEVEZE	Biologie marine
S. TAXY (Mme)	Géologie historique
N. BLANCHARD	Mathématiques générales

Maîtres de conférences

MM. M.-L. FURNESTIN (Mme)	Biologie animale
M. BERTRAND	Chimie S.P.C.N.
J. TROMPETTE	Physique S.P.C.N.
R. MONIER	Chimie biologique
M. LAFFITTE	Chimie M.P.C.
L. SIDERIADES	Dynamique des vibrations
J. MANDELBROJT	Physique nucléaire
F. BOREL	Mathématiques
J. BLANC	Géologie marine
M. DUSSARDIER	Physiologie animale
R. CHANDEBOIS (Mlle)	Biologie animale

Chargés de conférences

MM. P. BENOIT	Physiologie
J. MORIN	Neurophysiologie
B. GOUZON	Physiologie
V. CHARLIER DE CHILLY	Mathématiques
H. GAVINI (Mlle)	Psycho-physiologie
P. JEAN	Physique
J. SENEZ	Chimie biologique
M. COTTON (Mme)	Mathématiques
H. GASTAUD	Neurophysiologie
M. BERAGUET	Chimie
S. GUEIRARD (Mlle)	Pétrographie
L. COHEN-SOLAL	Physique
R. MOLINIER	Biologie végétale
J. RICARD	Physiologie végétale
D. SCHACHTER (Mme)	Ecologie terrestre et limnique
L. GAFFIER	Botanique
LAGARDE (Mlle)	Chimie générale
CATZIGRAS (Mlle)	Géologie
MATTEI (Mme)	Botanique

A MA FEMME

A MA FILLE PASCALE

A M. Henry ROUX
Professeur à la Faculté de Médecine et Pharmacie

Je suis votre élève.

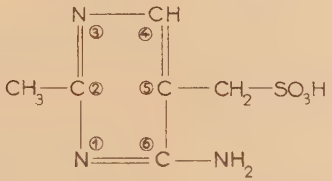
Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à M. le Professeur CALVET, Directeur de l'Institut de Microcalorimétrie, ainsi qu'à MM. les Professeurs CARPENI et METZGER pour leurs conseils et pour l'intérêt bienveillant avec lequel ils ont examiné notre travail.

INTRODUCTION

La structure chimique de la Thiamine ou Aneurine ou Vitamine B_1 est trop connue des chimistes pour que nous retracions dans le détail les différentes étapes qui ont permis de la préciser. Nous rappellerons seulement que WILLIAMS et ses collaborateurs clivèrent cette molécule au moyen du sulfite de sodium : ils obtinrent ainsi deux fragments faciles à séparer par différence de solubilité dans l'eau (1).

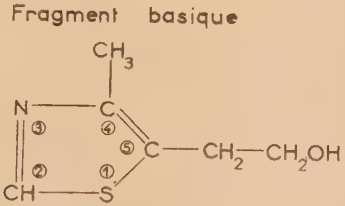
Les travaux de WILLIAMS, CLARKE, GURIN et RUEHLE permettaient d'identifier le fragment insoluble à la Méthyl —2 Amino —6 Sulfonyl Méthyl —5 Pyrimidine (2) :

Fragment insoluble



Le fragment soluble s'identifiait au Méthyl —4 β Hydroxyéthyl —5 Thiazole :

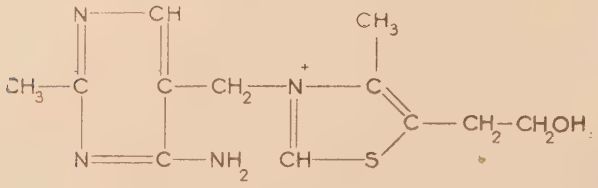
Fragment basique



WILLIAMS établissait enfin par titrage potentiométrique que la liaison du noyau thiazole au noyau pyrimidique s'effectuait au niveau de l'azote de l'hétérocycle, tétracoordiné dans la molécule d'aneurine. Le fragment acide sulfonique supporté

par le carbone en position 5 du cycle pyrimidique provenant du clivage par le sulfite de sodium, indiquait que l'hétérocycle était lié à ce niveau dans l'édifice moléculaire de la thiamine (3, 4).

La molécule d'aneurine était née :

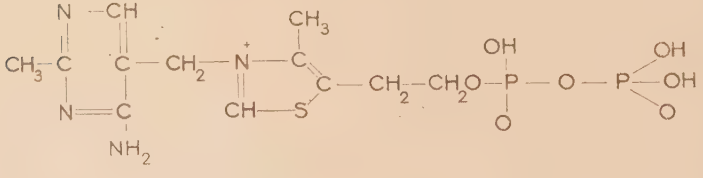


et Williams saluait en ces termes la naissance de la première molécule biochimique offrant un noyau thiazole : « C'est un fait hautement suggestif que l'organisme utilise des molécules aristocratiques pour effectuer des missions sortant de l'ordinaire ».

L'intérêt chimique et biochimique de la molécule de thiamine était considérablement accru du fait que la forme active de cette molécule était constituée par un ester phosphorique.

Un édifice moléculaire déjà remarquable en lui-même se trouvait de surcroît placé au cœur même du chapitre des molécules offrant des liaisons phosphoriques riches en énergie, chapitre dont on connaît l'importance biologique.

Lohman et Schuster du laboratoire de Meyerhoff à la suite d'une série de travaux remarquables, identifiaient le coenzyme de décarboxylation de l'acide pyruvique (la cocarboxylase) à l'ester pyrophosphorique de la thiamine (5) :



On trouvait en effet bientôt dans les tissus les esters monophosphorique et pyrophosphorique de la thiamine.

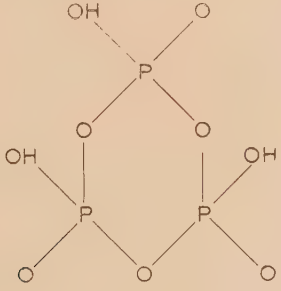
Après avoir mis au point une méthode de dosage de la thiamine par spectrophotométrie ultra-violette, Roux et ses collaborateurs furent amenés, en appliquant cette méthode aux extraits tissulaires, à soupçonner que la thiamine existait éga-

lement dans les tissus sous d'autres formes que l'ester pyrophophorique (6, 7, 8), formes qui paraissaient se montrer plus riches en phosphore.

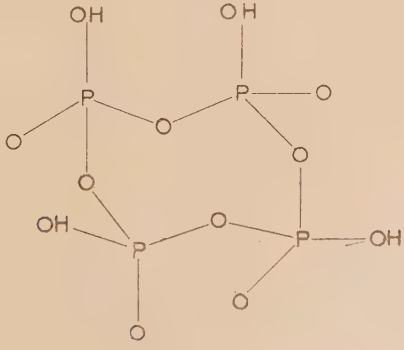
Cela conduisit ces auteurs à entreprendre un cycle de recherches d'ordre purement chimique destiné à réaliser la synthèse chimique des esters mono et pyrophosphorique et, eventuellement, la synthèse d'autres formes plus chargées en radicaux phosphoriques.

Comme il n'existait à cette date aucune méthode de synthèse chimique permettant de fixer sur les molécules organiques des chaînes polyphosphoriques à plus de deux radicaux orthophosphoriques en chaîne, Roux et ses collaborateurs furent préalablement amenés à préparer un réactif de phosphorylation constitué par des chlorures d'acides polyphosphoriques obtenus comme produits d'hydrolyse aqueuse de l'oxychlorure de phosphore (9, 10).

Rappelons ici que les différents acides phosphoriques dérivant de l'anhydride P_2O_5 forment deux groupes bien distincts :
— Le groupe des acides métaphosphoriques de structure cyclique dont l'acide trimétaphosphorique :

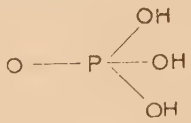


et l'acide tétramétaphosphorique :



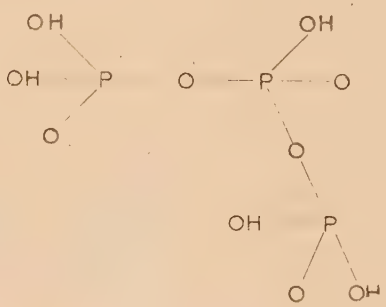
— Le groupe des acides polyphosphoriques de structure linéaire dont :

l'acide orthophosphorique :



l'acide pyrophosphorique :

l'acide tripolyphosphorique :



On a caractérisé tous les termes de la série jusqu'au degré de condensation égal à 8 (11) mis en évidence par Thilo.

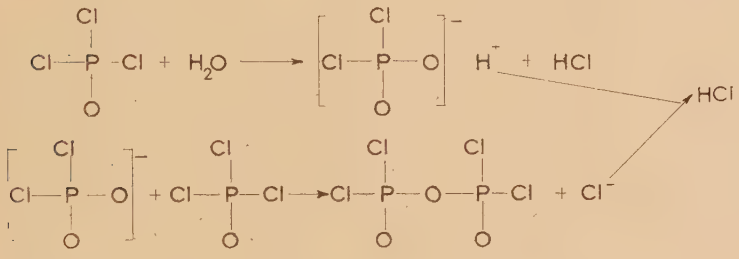
Dans ce groupe des polyphosphates linéaires entre indiscutablement actuellement (12) le sel de Graham, longtemps considéré comme un hexamétaphosphate cyclique. De même, les sels peu ou pas solubles de Madrell et de Kurrol y entrent également.

Roux et ses collaborateurs établirent que leur réactif obtenu par hydratation ménagée de l'oxychlorure de phosphore renferme bien des chaînes polyphosphoriques qui offrent des longueurs variables suivant le solvant utilisé pour dissoudre le réactif (9, 10).

Dissous dans l'eau et neutralisé avec du carbonate de sodium, la chromatographie sur papier met en évidence les ortho, pyro, trimétaphosphates et des traces de composés plus condensés.

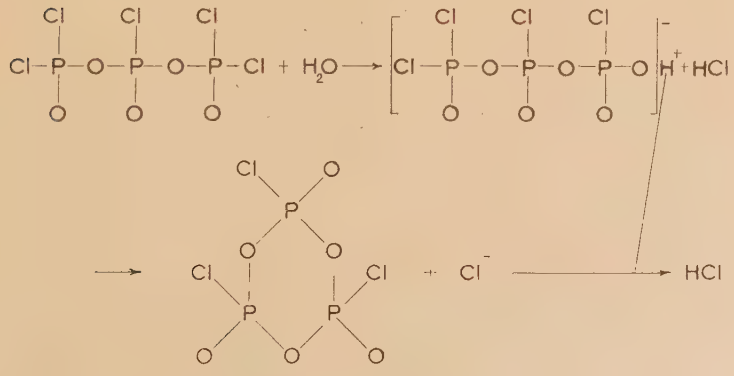
Dissous dans l'acétone aqueuse et neutralisé, on met en évidence des chaînes linéaires dont le degré de condensation est supérieur à 7 maillons orthophosphoriques. On met également en évidence les triméta et tétramétaphosphates de sodium (9, 10).

Le mécanisme de formation de ces chaînes peut être le suivant :

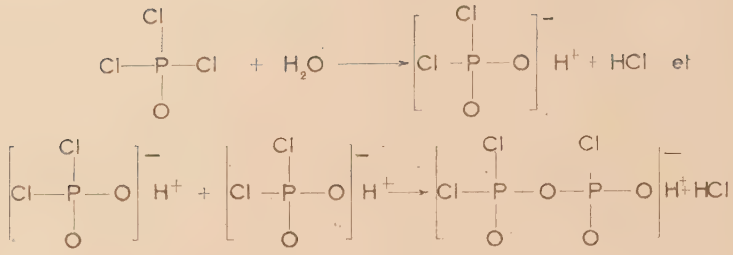


et ainsi de suite.

Les chaînes triphosphoriques à 3 maillons se cycliseraient très facilement :



Le mécanisme suivant est également possible :



De toute manière et quel que soit le mécanisme intime des réactions d'hydrolyse, Roux et ses collaborateurs établissaient indiscutablement par analyse chromatographique, que l'oxychlorure de phosphore hydraté se présentait comme un mélange d'acides polyphosphoriques de degré de condensation variable (9, 10). Viscontini (13) isola de ce réactif par distillation sous vide la fraction renfermant le constituant dont le degré de condensation était 2, et en le soumettant à l'analyse chimique, il établit qu'il s'agissait bien du chlorure de l'acide pyrophosphorique : $P_2O_3Cl_4$; les chaînes polyphosphoriques se trouvaient bien à l'état de chlorure d'acide dans le réactif. La grande réactivité qui en résulte a permis déjà de nombreuses synthèses d'esters phosphoriques : c'est ainsi par exemple que Viscontini et Bonetti l'ont utilisé pour la synthèse du pyridoxal acétate —3 —pyrophosphate et que Todd s'est également servi de l'oxychlorure de phosphore hydraté pour la synthèse de la lactoflavine phosphate (14, 15). Roux et ses collaborateurs avaient pu, grâce à leur réactif, fixer (16, 17, 18, 19) deux chaînes polyphosphoriques de longueurs variables sur la molécule de thiamine, l'une sur la fonction alcool du noyau thiazole par liaison d'ester et l'autre sur l'amine de la pyrimidine par liaison d'amide.

Ces esters amides polyphosphoriques de la thiamine étaient isolés, suivant la longueur des chaînes polyphosphoriques fixées sur la molécule organique, par précipitation fractionnée dans l'acétone à taux aqueux variable. Le dosage de la molécule de thiamine était effectué par spectrophotométrie ultra-violette suivant la méthode de Roux, le dosage du phosphore hydrolysable était effectué par la méthode de Beren-Blum et Chain (20) et le dosage du phosphore total était effectué par la même méthode après minéralisation. Les dosages ainsi pratiqués sur ces esters établissaient l'existence d'un excès de deux atomes de phosphore total par rapport au nombre des atomes de phosphore hydrolysable par molécule de thiamine.

Roux et ses collaborateurs montraient bien ainsi l'existence de deux liaisons covalentes entre la molécule de thiamine et deux chaînes polyphosphoriques (18, 19).

Ces auteurs établissaient définitivement ce fait en clivant la molécule d'ester amide polyphosphorique de la thiamine au niveau du pont méthylène par le sulfite de soude suivant Williams : Roux et ses collaborateurs constataient la présence de phosphore lié par covalence sur chacun des deux fragments isolés : le thiazole et la pyrimidine. Il restait à vérifier si les radicaux orthophosphoriques libérés par l'hydrolyse acide appartenaient tous bien aux chaînes polyphosphoriques liées par covalence.

On aurait pu, par exemple, obtenir une simple salification des azotes de la molécule de thiamine par des chaînes polyphosphoriques. C'est ainsi, par exemple, qu'un ester amide à 4 atomes de phosphore hydrolysable et 6 atomes de phosphore total aurait pu être constitué par fixation covalente de deux chaînes à deux radicaux orthophosphoriques et d'une chaîne également à deux radicaux salifiant l'azote tétracoordiné du thiazole. Roux et ses collaborateurs ont établi qu'aucune chaîne polyphosphorique ne salifiait les azotes quaternaires en montrant par chromatographie sur papier de solution d'esters amides polyphosphoriques de la thiamine (que nous nommerons désormais E.A.P.P.) qu'aucun radical mono ou polyphosphorique ne migrait (21, 9).

Roux et ses collaborateurs ont également étudié quelques unes des conditions de stabilité des chaînes polyphosphoriques fixées sur la thiamine : ils ont établi que les sels de sodium sont stables à tous les pH, mais qu'on en détache des chaînes polyphosphoriques en présence de cations divalents : Ca^{++} et Ba^{++}, et que de la cocarboxylase apparaît dans le milieu. Ce résultat était en faveur d'une labilité particulière de la liaison d'amide et de fait, Roux et ses collaborateurs montraient que le sel de baryum de l'ester amide monophosphorique de la thiamine était très instable en milieu acide, le sel de sodium n'offrant lui-même qu'une stabilité relative : en milieu réducteur, ce dernier libérait le radical orthophosphorique fixé sur l'amine (21).

Après avoir ainsi synthétisé et caractérisé ces nouveaux esters polyphosphoriques de la thiamine et après avoir étudié quelques unes de leurs conditions de stabilité, le long mais fructueux cycle chimique se trouvait fermé et Roux et ses collaborateurs pouvaient reprendre en toute connaissance de cause l'étude du problème biochimique posé par ces composés.

Cette étude fut entreprise suivant les deux voies complémentaires :

1° Etude biologique de ces composés utilisées à doses parfois pharmacodynamiques, dans le but d'orienter la recherche de leur rôle possible dans les organismes, au cas où l'on pourrait établir leur présence naturelle dans les tissus à côté de la cocarboxylase.

2° Etude de la mise en évidence de ces esters dans les tissus.

Dès 1950, Roux et ses collaborateurs établirent que les E.A.P.P. à très courtes chaînes polyphosphoriques étaient doués d'une activité cocarboxylasique tandis que les esters à longues chaînes polyphosphoriques étaient dénués de cette action (22, 23, 24). Ils établissaient également que ces mêmes composés à longue chaîne polyphosphorique ralentissaient la formation d'acide lactique au sein d'une chaîne fermentaire réalisée avec du sang humain normal lavé avec une solution de Ringer alcaline. Ces composés ralentissaient dans les mêmes conditions la disparition du sucre libre : ils freinent donc la glycolyse (25).

Plus récemment encore, nous avons pu nous-même, sous la direction de H. Roux, préciser le mécanisme de ces actions inhibitrices (26). Nous avons en effet, établi *in vitro* que les E.A.P.P. inhibaient l'activité de la cocarboxylase et de l'hexokinase tout comme le diphosphate et le triphosphate de sodium (27) ; nous établissions que les composés polyphosphoriques cycliques (triméta et tétramétaphosphate de sodium) étaient dénués de cette action.

L'inhibition est due à un mécanisme compétitif entre les composés polyphosphoriques linéaires actifs et l'ATP ou la cocarboxylase.

Ces esters se montraient également actifs *in vivo* sur la glycémie du chien normal et diabétique (28).

A ce rôle glucidique des E.A.P.P. s'ajouta bientôt un second rôle biologique de ces composés : rôle neuromusculaire mis en évidence par Roux et ses collaborateurs en 1951. Ces composés polyphosphoriques se révélaient être de puissants stimuli chimiques de la fonction neuromusculaire : injectés à l'animal, ils provoquaient une crise contracturante du type tétanique d'une rare intensité (29, 30).

En fait, il ne fallait pas être tellement surpris de la manifestation de cette seconde fonction par des composés aussi richement chargés en chaînes polyphosphoriques. On sait en effet, que les composés organiques di et triphosphoriques

potentialisent une importante énergie chimique et on connaît le rôle fondamental joué par ces composés dans les deux processus gludicique et neuromusculaire, processus si fortement imbriqués d'ailleurs. Il suffira pour s'en convaincre de rappeler les nombreuses fonctions que l'on connaît à l'adénosine triphosphorique, seul ester à trois radicaux phosphoriques en chaîne connu jusqu'ici. L'ATP intervient comme on le sait, dans le cycle des processus contractiles musculaires et on en fait le carburant musculaire (Szent - Györgyi) ; il joue par ailleurs le rôle d'accepteur et de donneur de radicaux orthophosphoriques dans les processus glucidiques. Du fait qu'avec les E.A.P.P. on obtenait des esters d'une molécule biochimique (la thiamine) à plus de trois atomes de phosphore en chaîne, on pouvait s'attendre à ce qu'ils fussent doués d'actions importantes dans les deux domaines complémentaires : glucidique et neuromusculaire.

Behrens et Seelkopf établissaient déjà en 1932 (31) qu'un mélange de composés polyphosphoriques minéraux était doué de propriétés convulsivantes. Buchtal et Kahlson en 1944 (32) avaient étudié avec des moyens d'investigation plus modernes l'action contracturante de divers composés polyphosphoriques minéraux et organiques : essentiellement le pyrophosphate et le tripolyphosphate de sodium, l'ATP et l'ADP. Ces auteurs établissaient bien que ces composés étaient de puissants stimuli du muscle : le muscle libérait sous leur effet une contraction tétanique. Toutefois, nous le répétons, ce qui retenait plus particulièrement l'attention dans le cas des E.A.P.P., c'est qu'il s'agissait d'esters polyphosphoriques offrant des chaînes plus longues que celles portées par les composés jusqu'alors étudiés, chaînes portées en outre par la thiamine. C'est qu'en effet s'il est classique que l'activité nerveuse s'accompagne d'une apparition de radicaux orthophosphoriques, Minz, de plus, a établi en 1939 (33) que cette activité nerveuse s'accompagne également d'une libération de thiamine hors de l'axone. En outre Von Muralt (34) établissait de son côté en 1944, que la thiamine existait dans le nerf sous la forme d'une combinaison inconnue, différente de la cocarboxylase. Pour ces raisons Roux et ses collaborateurs entreprirent l'étude de l'action neuromusculaire des E.A.P.P.

Ils comparèrent (35) d'abord l'effet contracturant provoqué par leurs propres composés avec celui provoqué par les différents composés polyphosphoriques minéraux. Sur le chien normal, le pyrophosphate de sodium ne provoque qu'une contracture de faible intensité, tandis que le tripolyphosphate provoque une contracture la plupart du temps plus puissante ; le sel de Graham, qui contient de longues chaînes, contracture

encore plus intensément l'animal. Avec les E.A.P.P. on obtient des contractures dont l'intensité, suivant la longueur des chaînes, est analogue à celle obtenue avec le pyrophosphate, le tripolyphosphate ou le sel de Graham. Mais dès que les chaînes atteignent une certaine longueur, la crise contracturante obtenue est d'une très grande violence et impossible à provoquer avec les composés polyphosphoriques minéraux quelle que soit leur longueur.

Dans le but de mettre ces différences macroscopiques en évidence, Roux et ses collaborateurs ont expérimenté sur le chien à moelle sectionnée et ils ont enregistré le myogramme relatif au jambier antérieur, la contraction étant provoquée par injection intra-artérielle des différents composés polyphosphoriques dans l'artère fémorale de la patte correspondante. Le pyrophosphate donne plus souvent que le tripolyphosphate des myogrammes à faible pente d'établissement. Les E.A.P.P. peuvent donner l'un ou l'autre type de myogramme suivant la longueur des chaînes polyphosphoriques fixées (35).

A la suite de ces premiers résultats, ils ont cherché à explorer plus finement cet effet au moyen de la technique d'enregistrement des courants d'action. Ils ont enregistré et étudié comparativement les courants d'action du muscle stimulé avec le pyrophosphate, le tripolyphosphate de sodium et avec les E.A.P.P. de longueur de chaîne variable (36, 37).

Les tracés obtenus avec le pyrophosphate et le tripolyphosphate de sodium sont analogues à ceux obtenus au cours de la contraction musculaire sous-maximale : les tracés offrent de nombreuses pointes sur lesquelles se détache fréquemment une onde plus grande résultant de la sommation de deux unités motrices dans le territoire de l'électrode. Ces tracés sont classiquement attribués aux contractions tétaniques asynchrones de nombreuses unités motrices du muscle. Quelquefois, on enregistre une grande onde diphasique isolée qui témoigne d'une synchronisation fugace des rythmes tétaniques. De toute manière aucun rythme véritable de Piper ne s'amorce jamais.

Avec les E.A.P.P. à longues chaînes polyphosphoriques le tracé est du type de ceux fournis par la contraction musculaire maximum. On obtient de grandes ondes de sommation des courants d'action des diverses unités motrices du territoire de l'électrode, unités motrices qui synchronisent leurs rythmes tétaniques, ce qui fournit un véritable rythme de Piper. Pour des esters à chaînes polyphosphoriques plus courtes, les tracés s'apparentent à ceux fournis par le pyrophosphate de sodium. Ces différents composés polyphosphoriques agissent sur la cellule nerveuse à l'exclusion de la cellule musculaire.

Il était donc bien établi que les E. A. P. P. se classaient parmi les plus puissants et les plus adéquats stimuli polyphosphoriques de la cellule nerveuse.

Une question se posait alors : comment pouvaient-ils intervenir dans les mécanismes intimes métaboliques liés à l'excitabilité nerveuse ?

Rappelons quelques aspects de ces mécanismes. Dans la fibre nerveuse au repos, la concentration en ions K^+ est élevée par rapport à celle des ions Na^+ (360 milliéquivalents de K^+ par litre de liquide intracellulaire contre 51 de Na^+), tandis que ces proportions sont inversées dans l'espace extracellulaire (440 milliéquivalents par litre de Na^+ contre 22 de K^+). La membrane limitant l'axone est pratiquement imperméable au repos aux ions sodium, mais par contre, elle se laisse franchir par les ions potassium qui doivent être considérés comme librement diffusibles. La concentration en ions sodium est faible à l'intérieur de la fibre, d'une part parce que la membrane limitant l'axone leur est imperméable, d'autre part parce qu'un processus métabolique, dont nous dirons un mot plus loin, les a refoulés hors de l'axone. Donc, pour rétablir la balance des cations à l'intérieur de la fibre la concentration en ions potassium est plus élevée bien que ce cation soit bien diffusible.

Ainsi donc, à la différence de concentration de ces ions K^+ diffusibles, de part et d'autre de la membrane, correspond la différence de potentiel enregistrée :

$$E = 58{,}5 \log \frac{C_i}{C_e} \quad \text{à } 22° \text{ C}$$

C_i = Concentration à l'intérieur de la fibre ;

C_e = Concentration à l'extérieur de la fibre.

Au moment de l'activité nerveuse, la résistance électrique de la membrane s'effondre et avec elle la barrière qui empêchait le passage des ions sodium. Ces derniers pénètrent alors facilement dans la fibre par simple diffusion passive due à l'inégalité de leur concentration de part et d'autre de la membrane. Peu après, les ions potassium quittent également passivement la fibre pour les mêmes raisons. La passivité de ces mouvements d'ions qui tendent à la simple égalisation de leurs concentrations de part et d'autre de la membrane limitante a été établie en montrant que ces mouvements ioniques ne sont pas influencés par les inhibiteurs de métabolisme (KCN, dinitrophénol). Par contre, après le retour à l'état de repos, l'efflux des ions sodium est un mouvement ionique qui se produit contre un gradient de concentration. Il a été établi que ce mouvement

est actif en ce sens qu'il est lié à un apport d'énergie métabolique.

Il existe un mécanisme chimique actif susceptible d'évacuer continuellement l'ion sodium de l'intérieur de la cellule vers l'extérieur : il existe une véritable pompe au sodium (Hodgkin). Et Ussing (38) d'écrire : « Il est évident que la pompe réclame les apports d'une autre substance riche en énergie en sus de l'ATP. Nous ne pouvons pas à présent rejeter l'hypothèse que la seconde source d'énergie est le phosphate d'arginine, mais il doit y avoir également un autre composé phosphorique produit parallèlement à l'ATP et qui n'est pas identifié, car il n'est pas présent en grande quantité. »

Roux et ses collaborateurs se sont dès lors demandés si les esters amides polyphosphoriques de l'aneurine qui potentialisent une grande énergie chimique du fait de leur longue chaîne polyphosphorique, énergie spontanément libérable du fait de l'instabilité de ces composés, ne pouvaient pas jouer un rôle dans le mécanisme de la pompe au sodium.

Divers auteurs ont établi que les chaînes polyphosphoriques minérales fournissaient avec le sodium et des cations divalents des sels partiellement indissociés, certains auteurs parlent même de complexe (39, 40). Ce fait conduisait à l'hypothèse de travail exprimée ci-dessous : l'étude de la dissociation des sels de sodium et de potassium des E.A.P.P.

OBJET DE NOTRE TRAVAIL

Certes, pour situer et montrer l'intérêt général de notre travail qui se rapporte à l'une des étapes des recherches entreprises par Roux et ses collaborateurs sur les composés polyphosphoriques de la thiamine, nous avons retracé succinctement dans notre introduction le cadre général de ces recherches et nous y avons situé les résultats déjà obtenus. Toutefois, notre travail peut faire abstraction de ce contexte, en particulier du contexte biochimique ; il forme en effet en lui-même un tout physico - chimique en dehors de toute hypothèse de travail préalable.

Il s'agit en effet de l'étude comparée de la dissociation des sels de sodium et de potassium de quelques composés polyphosphoriques minéraux ou organiques et des esters amides polyphosphoriques de la thiamine. Nous avons, à l'instar de Wazer et Campanella (39), utilisé les deux méthodes titrimétrique et polarographique qui permettent d'atteindre le degré de dissociation d'un sel.

CHAPITRE I

RÉACTIFS UTILISÉS

Il est clair que les résultats obtenus avec les E.A.P.P. ne pouvaient prendre toute leur signification que comparés à ceux obtenus dans les mêmes conditions avec divers acides polyphosphoriques minéraux et organiques.

C'est ainsi qu'en titrimétrie, nous avons opéré non seulement avec les E.A.P.P., mais également avec l'acide phosphorique, l'acide tripolyphosphorique, les acides polyphosphoriques composant le sel de Graham, l'ATP et la cocarboxylase. Pour l'étude polarographique nous avons en outre opéré avec l'acide pyrophosphorique et l'acide trimétaphosphorique.

a) Nous avons utilisé l'acide orthophosphorique R.P. Prolabo.

b) Les solutions d'acide tripolyphosphorique sont préparées à partir du tripolyphosphate de sodium pur Progil par échange d'ions sur résine, suivant la méthode d'Eeel (41) :

100 cm^3 d'une solution à 1 g. p. cent de tripolyphosphate de sodium sont précipités par 40 cm^3 d'une solution de chlorure de baryum à 20 g. p. cent. Le précipité est recueilli sur un buchner et lavé à l'eau distillée jusqu'à ce que les eaux de lavage ne précipitent plus par le nitrate d'argent.

On porte alors le précipité dans un cristallisoir contenant 30 g. d'amberlite I.R. 120 (résine échangeuse de cations) et 30 cm^3 d'eau. On agite mécaniquement pendant deux heures en glaçant. Le précipité blanc a disparu et le pH de la solution est acide. On filtre et rince la résine. Le filtrat contient l'acide tripolyphosphorique que l'on conserve à 0° C.

c) Les solutions d'acides polyphosphoriques et d'acide pyrophosphorique sont obtenues exactement de la même manière à partir de solution de sel de Graham et de pyrophosphate de sodium à 4 g. p. cent.

d) Pour les solutions d'acide trimétaphosphorique nous

partons d'une solution de trimétaphosphate de sodium Progil à 10 g. p. cent alcalinisée jusqu'à pH 10 avec de la soude normale. Ensuite, même mode opératoire que pour les autres acides.

e) L'ATP utilisé est le sel disodique fourni par la Firme Auclair. Pour les études titrimétriques, nous avons utilisé des solutions de sel disodique d'ATP sans aucun traitement préliminaire.

Par contre, pour l'expérimentation polarographique où comme nous le verrons plus loin, nous devrons utiliser les formes acides, nous avons échangé l'ATP disodique sur amberlite I.R. 120.

Nous opérons ainsi :

1 g. d'ATP est dissous dans 10 cm^3 d'eau puis agité avec 5 g de résine I.R. 120 pendant une heure en glaçant. On filtre, on rince avec 5 cm^3 d'eau. Puis on agite avec 5 nouveaux grammes de résine pendant une heure. On filtre et on rince à nouveau avec 5 cm^3 d'eau.

La solution contient l'acide adénosine triphosphorique que l'on conserve à 0° C.

Un contrôle chromatographique du composé obtenu ne permet pas de déceler d'altération sensible du composé, alors que la méthode de précipitation par le baryum l'hydrolysait en partie.

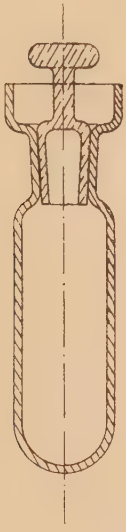
f) Nous utilisons la cocarboxylase Roche livrée sous forme acide.

g) Nous synthétisons les E.A.P.P. selon la méthode de H. Roux (18, 19), mais comme certaines modifications ont été apportées à la technique, il nous a paru bon de la décrire à nouveau complètement :

1 g. de thiamine pulvérisée finement au mortier est porté dans un tube de verre à paroi épaisse, bouché à l'émeri et muni d'une collerette. On ajoute alors 4 cm^3 de réactif polyphosphorique.

On bouche rapidement en posant simplement le bouchon de verre sans le coincer et on verse du mercure dans la collerette, ce qui permet à l'HC1 qui se forme de se dégager sans laisser pénetrer l'humidité de l'air. On glace pendant une heure, puis on laisse 15 heures à la température du laboratoire. On glace alors à nouveau pendant une heure. On obtient au fond du tube une masse translucide incolore ou légèrement rosée. On ajoute alors environ 30 cm^3 d'acétone R.P. glacée.

On triture avec une gros agitateur, le produit se prend en masse et blanchit.



On décante l'acétone et on ajoute 30 cm³ d'acétone à 1 p. cent d'eau glacée. on triture et on laisse reposer quelques minutes. On décante l'acétone et on en élimine les dernières traces à l'aide d'une trompe à vide.

On dissout le magma dans 12 cm³ d'eau glacée : on obtient la « liqueur totale ». On l'ajoute goutte à goutte dans 340 cm³ d'acétone glacée en agitant vigoureusement. On laisse 3 heures au repos. On centrifuge et on dissout le culot de centrifugation dans 20 cm³ d'eau glacée. On obtient ainsi ce que nous appellerons : la « liqueur acide ». Du fait de la grande solubilité des acides polyphosphoriques minéraux dans l'acétone, solubilité que nous avons d'ailleurs vérifiée, on peut donc assurer que cette liqueur acide ne contient pratiquement plus que des composés organiques, c'est-à-dire thiamine non phosphorylée, phosphate d'aneurine, cocarboxylase et E.A.P.P. à chaîne phosphorique plus ou moins longue, à l'exclusion des composés minéraux libres.

Du fait de la relative instabilité des E.A.P.P. sous forme acide, il nous était impossible de séparer plus finement ces composés sous cette forme. C'est pourquoi nous avons opéré directement sur la liqueur acide. Mais les résultats très positifs obtenus avec ce mélange ne peuvent être attribués qu'aux seuls E.A.P.P. du fait, comme nous le montrerons plus loin, que la cocarboxylase et la thiamine sont dénuées de toute action en ce domaine.

Cependant, pour certaines de nos expérimentations, il a été nécessaire d'utiliser des E.A.P.P. purifiés. Pour ce faire, nous avons utilisé la précipitation fractionnée à l'acétone :

La liqueur acide est neutralisée jusqu'à pH 4,8 avec une solution de $Na_2 CO_3$ à 8 p. cent.

— On ajoute alors de l'acétone jusqu'à louche persistant. On laisse déposer 12 à 15 heures et on obtient au fond du ballon un liquide d'aspect huileux.

— On décante le liquide surnageant et on dissout la « goutte huileuse » dans de l'eau. On obtient ainsi les E.A.P.P. de tête à chaîne phosphorique la plus longue. Nous appellerons cette solution : solution C_0 (cristallisation de tête).

— On ajoute alors à nouveau de l'acétone dans le surnageant, ce qui fournit une nouvelle cristallisation qui, reprise comme ci-dessus, fournit ce que nous appellerons la solution C_1 qui contient les E.A.P.P. à chaînes plus courtes que ceux constituant la solution C_0. On peut ainsi séparer les E.A.P.P. de la thiamine et de la cocarboxylase, car ces derniers composés ne précipitent que pour de fortes teneurs en acétone.

Il est évidemment possible de fractionner encore plus finement les E.A.P.P. d'une solution C_0 ou d'une solution C_1. Pour cela, il suffit d'ajouter de l'acétone à la solution C_0 jusqu'à louche persistant et de laisser déposer.

Après décantation et dissolution, on obtient ce que nous appellerons une solution R_0 ; et si l'on poursuit la précipitation dans le surnageant, on obtient une solution que nous appellerons R_1 et ainsi de suite.

CHAPITRE II

TECHNIQUES UTILISÉES

A. — TITRIMÉTRIE

La technique titrimétrique est trop connue pour que nous décrivions le principe de la mesure électrométrique du pH des solutions. Nous indiquerons que nous avons utilisé un pHmètre Tacussel à électrode de verre et électrode au calomel de référence. La base neutralisante utilisée fut l'hydroxyde de tétraméthylammonium Prolabo.

B. — POLAROGRAPHIE

La technique polarographique permet l'analyse qualitative et quantitative d'un certain nombre de cations. En explorant ainsi polarographiquement deux solutions d'ions Na^+ de même concentration ionique avec et sans addition d'E.A.P.P., nous devions nous attendre à mettre en évidence une diminution de la concentration ionique en Na^+ dans la première solution, toutes choses étant égales par ailleurs.

La technique polarographique ne peut fournir de résultats valables que sous certaines conditions qui, si elles sont relativement simples pour les cations lourds, sont très strictes avec les cations alcalins du fait qu'on est dans l'obligation d'opérer à des potentiels très négatifs : entre — 1,8 et — 2,4 volts, ce qui augmente considérablement les difficultés de l'expérimentation. Pour être mieux à même de juger des obstacles que nous avons été obligés de surmonter, il convient de résumer rapidement ce qu'est la théorie de la polarographie.

§ I. — DEFINITION

La polarographie est la méthode d'analyse basée sur l'interprétation des courbes courant-tension obtenues par électrolyse entre une électrode polarisable à gouttes de mercure et une électrode non polarisable constituée par une large surface de mercure.

§ II. — RAPPELS SOMMAIRES SUR LA THEORIE DE LA POLAROGRAPHIE

Soit un métal M de valence z (42, 43). Au cours de l'électrolyse les ions métalliques se déchargeant à la cathode à goutte passent à l'état d'atomes et forment avec le mercure un amalgame généralement très dilué, ce qui provoque une polarisation. En admettant que les concentrations sont faibles, on peut confondre activité et concentration.

Si l'on pose $\pi_0 = 0$: potentiel de l'électrode impolarisable et E différence de potentiel appliquée entre les deux électrodes, on a :

$$E = \pi = \frac{RT}{zF} \text{ Log } k \frac{Ca}{Cs} \qquad (1)$$

où Ca est la concentration en ions métalliques dans l'amalgame et Cs la concentration dans la zone contiguë à l'électrode, k désignant une constante caractéristique du métal.

Bien que l'intensité au cours du développement de chaque goutte varie, le dispositif d'enregistrement du fait de sa grande période n'indique que la valeur moyenne et les fluctuations de l'intensité sont petites.

$$I = \frac{1}{t_1} \int_0^{t_1} i\,dt \qquad (2)$$ t_1 = durée de formation d'une goutte

D'après les lois de Faraday, la concentration du métal amalgamé est proportionnelle à l'intensité :

$$Ca = k' I \qquad (3)$$

Pour les densités de courant faibles, on peut considérer en moyenne que la concentration en ions au niveau de l'électrode Cs est égale à celle au sein de la solution C, c'est-à-dire que dans la couche contiguë à l'électrode, il arrive autant d'ions par migration sous l'influence du champ électrique que ce qu'il s'en décharge.

On tire alors de 1 et 3 :

$$E = \pi = \frac{RT}{zF} \text{ Log } \frac{k\,k'\,I}{C}$$

ou :

$$I = \frac{C}{K\,K'} e^{\frac{EzF}{RT}}$$

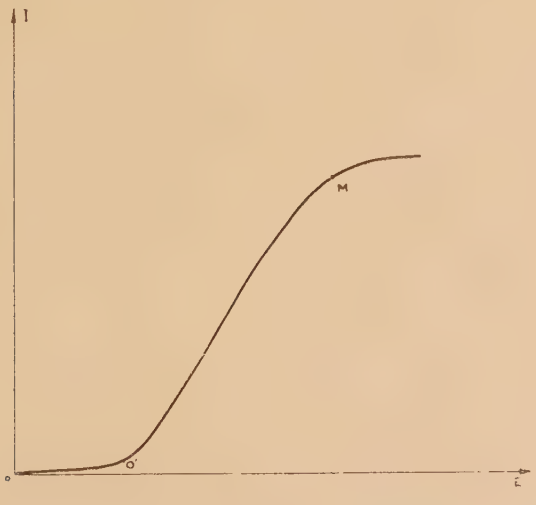
Mais pour des intensités de courant assez grandes, l'appauvrissement du liquide dans la couche contiguë à la goutte de mercure devient considérable et la compensation se fait alors grâce à la diffusion, si bien qu'en régime stationnaire la vitesse de décharge des ions sur l'électrode est égale à la vitesse du courant de diffusion.

$$k'' I = C - C_s \qquad \text{d'où}$$

$$E = \pi = \frac{RT}{zF} \log \frac{k k' I}{C - k'' I} \quad \text{d'où} \quad I = \frac{1}{k''} \cdot \frac{C}{\frac{kk'}{k''} e^{-\frac{EzF}{RT}} + 1}$$

et l'on voit que quand E $\longrightarrow \infty$, I tend vers une limite, i_l.

$i_l = \frac{c}{k''}$ c'est l'intensité limite proportionnelle à la concentration en l'ion considéré dans la solution.



La courbe ci-dessus représente la variation de I en fonction de E. Entre O et O' (tension de décomposition), seul un léger courant passe. C'est le courant résiduel. De O' en M, l'appauvrissement à l'électrode est négligeable et la diffusion n'intervient pas.

A partir de M, ce facteur devient important et l'intensité tend vers une limite.

Le point d'inflexion de cette courbe est parfaitement déterminé par :

$\frac{d^2I}{d\Pi^2} = 0$ ce qui donne :

Intensité au point d'inflexion : $I_{inflex} = \frac{i_l}{2}$

Potentiel au point d'inflexion $\Pi_{inflex} = \frac{RT}{zF} \text{Log } k \frac{k'}{k''}$

Potentiel de 1/2 palier (ou potentiel de 1/2 vague), caractéristique de l'élément.

Le courant limite i_l est donc la somme de deux effets : un courant de migration dû au champ électrique établi entre les deux électrodes i_m et un courant de diffusion i_d.

Mais le courant de migration i_m est évidemment modifié par tous les phénomènes susceptibles de modifier les caractéristiques électriques de la solution d'électrolyte. Par exemple, si la solution contient de l'oxygène dissous, la décharge de celui-ci augmentant la chute ohmique de tension dans la solution va « exalter », c'est-à-dire, augmenter le courant de migration des ions se déchargeant à un potentiel plus négatif que l'oxygène. Il y a donc tout intérêt à annuler cette composante de migration. Pour cela, on ajoute un grand excès d'un électrolyte ne participant pas à la réaction aux électrodes « l'électrolyte support », et se déchargeant à un potentiel plus négatif que les ions étudiés. On réduit ainsi le nombre de transport de l'ion étudié à zéro, et le courant limite se réduit au courant de diffusion. On obtient ainsi des courbes dites « vagues polarographiques ».

C'est Ilkovic qui a exprimé la relation qui existe entre le courant de diffusion et la concentration. Il part des équations de Fick sur la diffusion linéaire, il les étend à la diffusion sphérique symétrique sur une électrode sphérique de volume constant, puis il transforme ces équations pour tenir compte de l'augmentation de l'aire du champ de diffusion pendant la durée de vie d'une goutte. Il arrive à l'expression de l'intensité instantanée :

$$i_t = 706\ z\ D^{\frac{1}{2}}\ Cm^{\frac{2}{3}}\ t^{\frac{1}{6}}\ \mu A \text{ où}$$

t est le temps

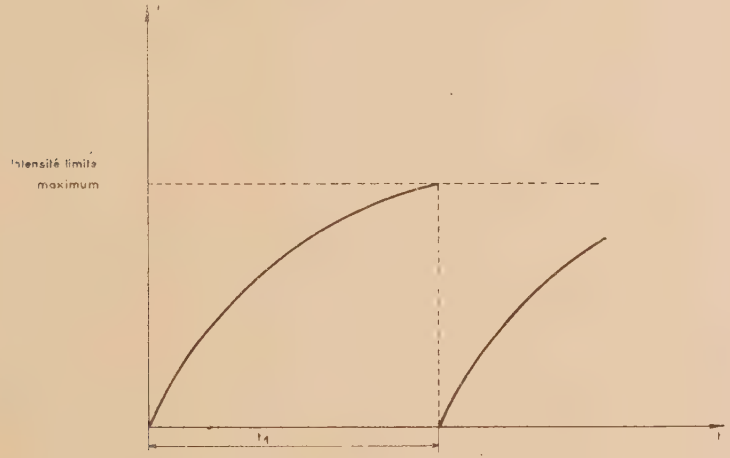
z la valence du métal considéré

D le coefficient de diffusion

C la concentration

m la masse de mercure qui sort du capillaire par seconde.

La variation de l'intensité limite instantanée est représentée par la courbe ci-dessous.



On définit l'intensité moyenne par :

$$\bar{I} = \frac{1}{t_1} \int_0^{t_1} i_t \, dt$$

où t_1 est le temps de formation d'une goutte.
c'est-à-dire :

$$\bar{I} = 605 \; z D^{\frac{1}{2}} \; Cm^{\frac{2}{3}} t_1^{\frac{1}{6}} \quad \mu A$$

Courant condensateur : On sait que sur une électrode métallique plongée dans un électrolyte se forme une double couche d'ions positifs et négatifs équivalente à un condensateur et dont la formation se traduit par un courant très faible et très vite disparu, analogue à un courant de charge. Par contre, avec une électrode à goutte, où la surface est constamment renouvelée, on observe un courant condensateur permanent qui augmente avec la tension appliquée.

Par ailleurs, on sait que la courbe électrocapillaire du mercure présente une forme parabolique avec un maximum au voisinage de —0,6 volt traduisant l'annulation de la double couche en ce point et son changement de signe. Si donc dans une solution contenant des ions alcalins on fait croître la tension à partir de 0 volt vers les potentiels négatifs, le courant condensateur va d'abord décroître, s'annuler à —0,6 volt puis croître en changeant de sens au fur et à mesure que la tension

va augmenter, ce qui fait qu'aux potentiels très négatifs, —2 volts par exemple, il sera très important.

On pourrait penser que dans une solution contenant des ions alcalins, à —2 volts, le courant résiduel soit égal au courant condensateur ; en fait, il est plus important car il vient s'y ajouter un courant faradique dû aux impuretés réductibles et un courant dit de fuite dû à une répartition de Boltzmann des ions de la solution autour des électrodes.

§ III. — CAS PARTICULIER DE LA POLAROGRAPHIE DES IONS ALCALINS

Dans la région des potentiels très négatifs, la décharge de l'hydrogène peut devenir gênante, mais, quoique les ions des métaux alcalins soient justement caractérisés par des potentiels de réduction très négatifs, des vagues bien développées peuvent être obtenues à partir de solutions neutres sans interférence avec l'hydrogène en raison de trois faits (44) :

a) La formation de composés stables entre le mercure et les métaux alcalins, à la fois à l'état solide et dans des amalgames liquides, diminue les potentiels de réduction de 1 volt environ par rapport aux métaux solides purs.

b) La réduction de l'ion hydrogène sur le mercure exige un potentiel d'environ 0,8 volt plus négatif que celui nécessaire avec le platine.

c) En solution neutre ou alcaline, le potentiel de réduction des ions hydrogène est de 0,5 à 0,8 volt plus négatif qu'en solution acide.

Le résultat cumulatif de ces trois effets est que les ions des métaux alcalins sont réduits plus facilement que l'ion hydrogène dans des solutions neutres ou alcalines.

Le choix de l'électrolyte support pour la détermination des ions alcalins est nécessairement limité du fait que le potentiel de 1/2 palier de ces ions est très négatif. En pratique, sont donc seuls utilisables les halogénures et les hydroxydes de tétraalkylammonium qui ont un potentiel de demi-vague plus négatif que —2,5 volts. Mais ces composés sont très difficiles à obtenir purs.

Signalons aussi que les vagues des métaux alcalins sont mieux développées dans un mélange d'eau et d'éthanol (ou d'autres alcools tel l'isopropanol) que dans un milieu purement aqueux, mais alors les potentiels de demi-vague sont légèrement plus négatifs et les valeurs du courant de diffusion diminuées en valeur absolue.

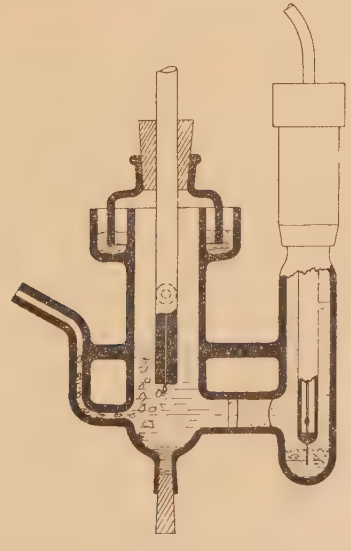
Le groupement serré des potentiels de demi-palier des métaux alcalins rend impossible leur discrimination polarographique et le mélange de deux ou de plusieurs d'entre eux ne fait que produire une seule vague cumulative.

Dernier point enfin : le courant résiduel est élevé aux potentiels très négatifs où se réduisent les ions alcalins, ce qui nécessite le tracé de polarogrammes à blanc effectués avec le seul électrolyte support.

A la suite de ce rapide exposé, nous voyons que l'obligation d'opérer avec les alcalins nous plaçait dans les plus mauvaises conditions, tant pour le choix de l'électrolyte support que pour l'existence d'un fort courant résiduel.

§ IV. — APPAREILLAGE

Pour les études polarographiques, nous disposions de l'appareil enregistreur Meci. Ce polarographe est livré avec une cellule de type en H qui comprend dans la branche de droite une électrode de référence au calomel. La jonction avec la branche contenant la solution étudiée est réalisée par une plaque de verre fritté et un tampon d'agar-agar. Ce dernier compartiment est muni de deux orifices permettant la désoxygénation de la solution et d'un troisième pour permettre l'écoulement des solutions.



L'électrode polarisable plongeant dans le liquide étudié s'apparente au type le plus couramment employé à écoulement

de gouttes de mercure. On réalise ainsi une électrode de très petite surface qui est rapidement et complètement polarisable D'autre part, le goute à goutte assure un renouvellement de la surface de l'électrode.

Pour que le tube capillaire calibré laisse écouler les gouttes avec une grande régularité, il est relié à un vase d'assez grande contenance, plein de mercure et maintenu à une hauteur constante. Ce vase est d'ailleurs en communication avec un tube de verre placé sur une règle graduée, ce qui permet de repérer et de conserver une hauteur de charge constante. La hauteur choisie pour notre étude est la graduation 2 de la règle. Notons toutefois que, pour les dernières expériences, nous avons été amenés à changer deux fois de tube capillaire et nous avons adopté la graduation 0. Le mercure utilisé a été redistillé. L'azote nécessaire à la désoxygénation est de l'azote « R » fourni par la Firme « l'Air liquide ».

Le pupitre de l'appareil porte un bouton à plusieurs positions permettant de faire varier la sensibilité. Dorénavant, pour spécifier la sensibilité utilisée, nous utiliserons le symbole Id suivi d'un chiffre correspondant à une position du bouton. Par exemple : Id 30 voudra dire que nous avons effectué l'enregistrement en adoptant une sensibilité telle que toute l'étendue de notre feuille correspond à 30 μA.

CHAPITRE III

MODES OPÉRATOIRES ET RÉSULTATS OBTENUS

A. — pHMÉTRIE

§ I. — MODE OPERATOIRE

1° Le premier impératif qui s'est posé était d'avoir une solution basique de titre constant. Or, l'hydroxyde de tétraméthylammonium livré par la Firme Prolabo est une solution de concentration mal déterminée (5 à 10 p. cent) et, en outre, le produit est hygroscopique. Ce qui fait que d'un envoi à l'autre, la basicité du produit variait dans des proportions considérables. Nous avons adopté le mode opératoire suivant :

a) la solution d'hydroxyde est refaite chaque jour et utilisée dans la journée.

b) elle est étalonnée par rapport à une solution acide de titre constant. Pour des raisons de commodités, nous avons choisi une solution de $H_2\ SO_4$ $\frac{N}{20}$.

Nous diluons la solution mère d'hydroxyde de telle sorte que 10 cm³ de la dilution soient neutralisés par 5 cm³ de la solution de $H_2\ SO_4$.

Cet étalonnage est effectué avant et après chaque série d'expériences.

2° Comme il nous était impossible de déterminer le nombre de fonctions acides des E.A.P.P. et des acides polyphosphoriques et que cependant il était nécessaire, pour avoir des résultats comparatifs, d'opérer avec des solutions de normalité à peu près identique, nous avons établi le protocole expérimental suivant :

Nous préparons une solution de l'acide à étudier telle que 10 cm³ de celle-ci soient amenés à pH 11 par 10 cm³ de la solution d'hydroxyde de tétraméthylammonium.

3° Les solutions acide et basique étant ainsi préparées, nous dressons 4 courbes de neutralisation en glaçant tout au long des opérations :

a) avec 10 cm³ d'acide pur,

b) avec 10 cm³ d'acide pur additionnés de 0,10 g. NaCl R.P. (soit environ $\frac{M}{6}$ en Na), nous avons choisi cette concentration car c'est celle du sérum humain,

c) avec 10 cm³ d'acide additionné de 0,12 g KCl R.P. (soit environ $\frac{M}{6}$ en K),

d) avec 10 cm³ d'acide pur. Nous nous assurons ainsi que l'acide polyphosphorique étudié ne s'est pas hydrolysé. Pour chaque acide, chaque série d'expériences est répétée 4 fois.

§ II. — RESULTATS OBTENUS

Nous donnons ci-dessous les tableaux de neutralisation obtenus avec chaque acide étudié :

a) Composés minéraux :

ACIDE PHOSPHORIQUE

cm³ tétraméthyl-ammonium ajoutés	Acide pur	Acide + NaCl	Acide + KCl	Acide pur
0	2,35	2,3	2,05	2,35
2	2,7	2,6	2,45	2.65
3	3,05	3	2,8	3
4	4,65	4,7	4,25	4,7
4,4	6	5,8	5,65	6
4,8	6,4	6,15	6,05	6,35
5	6,55	6,25	6,15	6,5
5,4	6,7	6,45	6,4	6,7
5,8	6,9	6,65	6,55	6,95
6	7	6,75	6,65	7
6,4	7,15	6,9	6,8	7,1
6,6	7,2	7	6,9	7,2
6,8	7,3	7,05	7	7,3
7	7,35	7,05	7,1	7,3
7,4	7,55	7,35	7,25	7,55
7,8	7,8	7,7	7,55	7,8
8,2	8,35	8,15	7,95	8,3
9	9,95	9,6	9,65	9,9
10	10,85	10,45	10,55	10,85

Ecart à pH 7,5 sodium : 0,20
potassium : 0,30

cm³ tétraméthyl-ammonium ajoutés	Acide pur	Acide + NaCl	Acide + KCl	Acide pur
0	2,35	2,25	2,25	2,4
2	2,7	2,6	2,6	2,65
3	3,05	2,95	2,95	3
4	4,5	4,7	4,5	4,5
4,4	5,95	5,8	5,75	5,95
4,8	6,35	6,15	6,15	6,35
5	6,5	6,25	6,25	
5,4	6,7	6,45	6,45	
5,8	6,9	6,65	6,65	6,85
6	7	6,75	6,75	7
6,4	7,15	6,9	6,85	
6,6	7,2	7	7.05	
6,8	7,3	7,05	7,1	7,3
7	7,35	7,15	7,15	7,35
7,4	7,55	7,35	7,35	
7,8	7,85	7,65	7,65	
8,2	8,35	8,2	8,15	8,3
9	9,4	9,65	9,80	
10	10,8	10,45	10,55	10,85

Ecart à pH 7,5 sodium : 0,20
potassium : 0,20

ACIDE PHOSPHORIQUE

cm³ tétraméthyl-ammonium ajoutés	Acide pur	Acide + NaCl	Acide + KCl	Acide pur
0	2,45	2,3	2,3	2,45
2	2,7	2,65	2,55	2,7
3	3,05	2,95	2,9	
4	4,45	3.95	4,2	
4,4	5,95	5,55	5,55	
4,8	6,35	6.05	6,05	
5	6,45	6,2	6,2	6,45
5,4	6,65	6,45	6,48	
5,8	6,85	6,65	6,6	
6	6,95	6,70	6,7	6,95
6,4	7,1	6,85	6,85	
6,6	7,15	6,95	6,95	7,15
6,8	7,25	7,05	7,05	
7	7,35	7,15	7,15	
7,4	7,55	7,35	7,35	
7,8	7,8	7,60	7,6	
8,2	8,35	8	8	8,35
9	9,85	9,60	9,6	9,85
10	10,85	10,55	10,55	

Ecart à pH 7,5 sodium : 0,20
potassium : 0,20

cm³ tétraméthyl-ammonium ajoutés	Acide pur	Acide + NaCl	Acide + KCl	Acide pur
0	2,45	2,35	2,4	2,5
2	2,65	2,65	2,65	2,65
3	3	3	3	
4	4,65	4,3	4,3	4,7
4,4	5,95	5,65	5,7	
4,8	6,35	6,1	6,15	
5	6,5	6,25	6,25	
5,4	6,7	6,45	6,5	6,7
5,8	6,9	6,65	6,65	
6	6,95	6,75	6,75	
6,4	7,15	6,95	6,95	
6,6	7,2	7	7	
6,8	7,3	7,05	7,05	
7	7,35	7,15	7,15	7,3
7,4	7,6	7,35	7,35	
7,8	7,85	7,65	7,65	
8,2	8,35	8	8	
9	10	9,55	9,55	
10	10,85	10,40	10,55	10,9

Ecart à pH 7,5 sodium : 0,25
potassium : 0,25

ACIDE TRIPOLYPHOSPHORIQUE

cm³ tétraméthyl-ammonium ajoutés	Acide pur	Acide + NaCl	Acide + KCl	Acide pur	cm³ tétraméthyl-ammonium ajoutés	Acide pur	Acide + NaCl	Acide + KCl	Acide pur
0	2,2	2,2	2,35	2,3	0	2,3	2,25	2,3	2,3
2	2,45	2,45	2,55		2	2,55	2,50	2,5	
4	3,15	3,1	3,15		4	3,1	3,05	3,1	3,1
6	6,45	5,95	5,9	6,4	6	6,2	5,70	5,65	
6,4	7,1	6,65	6,6	7,05	6,4	6,75	6,2	6,2	
6,6	7,55	6,95	6,95		6,6	7	6,5	6,5	
6,8	8,05	7,25	7,25		6,8	7,35	6,8	6,85	
7	8,45	7,55	7,55		7	7,8	7,15	7,15	7,8
7,2	8,65	7,75	7,7	8,65	7,2	8,3	7,45	7,5	
7,4	8,85	8	8,05		7,4	8,5	7,75	7,8	
7,6	9,1	8,15	8,25		7,6	8,8	7,95	8	8,75
7,8	9,3	8,4	8,5		7,8	9	8,15	8,2	
8	9,45	8,65	8,7		8	9,15	8,3	8,4	
8,5	9,8	9,3	9 5	9,75	8,5	9,6	8,9	8,9	9,55
9	10,35	10,1	10,05	10,35	9	10,1	9,6	9,7	
9,5	10,75	10,5	10,55		9,5	10,6	10,2	10,3	
10	11,1	10,9	11	11,1	10	11	10,7	10,8	10,9
Ecart à pH 7.5		sodium : 0,60 potassium : 0,60			Ecart à pH 7,5		sodium : 0,65 potassium : 0,65		

ACIDE TRIPOLYPHOSPHORIQUE

cm^3 tétraméthyl-ammonium ajoutés	Acide pur	Acide+NaCl	Acide + K Cl	Acide pur
0	2,25	2,3	2,3	2,25
2	2,5	2,5	2,5	
4	3,15	3,05	3,05	3,15
6	6,3	5,7	5,6	
6,4	6,75	6,25	6,2	
6,6	7	6,5	6,4	
6,8	7,45	6,8	6,8	
7	7,9	7,1	7,1	7,85
7,2	8,3	7,4	7,4	
7,4	8,5	7,65	7,7	8,5
7,6	8,8	7,9	7,9	
7,8	9	8,1	8,1	
8	9,2	8,3	8,35	9,15
8,5	9,6	8,9	8,9	
9	10,1	9,6	9,6	10,1
9,5	10,6	10,2	10,25	
10	11	10,6	10,8	10,95
	Ecart à pH 7,5	sodium : 0,65 potassium : 0,65		

ACIDES POLYPHOSPHORIQUES

cm³ tétraméthyl-ammonium ajoutés	Acide pur	Acide + NaCl	Acide + KCl	Acide pur	cm³ tétraméthyl-ammonium ajoutés	Acide pur	Acide + NaCl	Acide + KCl	Acide pur
0	2,25	2,15	2,05	2,35	0	2,2	2,05	2,05	2,25
2	2,35	2,25	2,1	2	2	2,35	2,15	2,15	
4	2,65	2,45	2,35	2,55	4	2,65	2,4	2,35	2,60
6	3,2	2,85	2,75		6	3,1	2,8	2,75	3,1
7	3,85	3,35	3,25	3,8	7	3,75	3,35	3,3	
7,2	4,15	3,6	3,55		7,2	4,1	3,65	3,55	
7,4	4,65	4	3,9		7,4	4,55	4,05	4,1	4,5
7,6	5,5	4,7	4,7	5,5	7,6	5,4	4,9	4,95	
7,8	6,4	5,3	5,3		7,8	6,35	5,45	5,50	
8	6,95	5,75	5,8		8	6,85	5,85	5,95	
8,2	7,4	6,25	6,15	7,4	8,2	7,35	6,35	6,35	
8,4	8,05	6,75	6,7		8,4	7,35	6,35	6,8	
8,6	8,75	7,5	7,2		8,6	8,55	7,65	7,7	8,5
8,8	9,25	8,1	8,2		8,8	9,15	8,45	8,55	
9	9,55	8,85	8,85	9,4	9	9,55	9	9,15	
9,4	10,2	9,65	9,75		9,4	10,05	9,8	9,85	10,05
10	10,8	10,35	10,5	10,8	10	10,8	10,35	10,55	
	Ecart à pH 7,5 sodium : 1,15 potassium : 1,25					Ecart à pH 7,5 sodium : 1 potassium : 1			

ACIDES POLYPHOSPHORIQUES

cm^3 tétraméthyl-ammonium ajoutés	Acide pur	Acide + NaCl	Acide + KCl	Acide pur
0	2,35	2,15	2,15	2,15
3	2,5	2,35	2,25	
4	2,65	2,5	2,4	2,55
6	3,2	2,85	2,8	3,1
7	3,95	3,35	3,35	
7,2	4,25	3,65	3,7	
7,4	4,9	4,15	4,2	
7,6	5,8	4,85	5,05	
7,8	6,5	5,45	5,55	
8	7,05	5,9	6,05	6,7
8,2	7,65	6,4	6,45	
8,4	8,25	7,15	7,15	8,05
8,6	9,05	8,05	8,65	
8,8	9,4	8,75	8,7	9,25
9	9,75	9,35	9,35	
9,4	10,35	10,05	10,05	
10	10,9	10,6	10,65	

Ecart à pH 7,5 sodium : 1,25
potassium : 1,2

cm^3 tétraméthyl-ammonium ajoutés	Acide pur	Acide + NaCl	Acide + KCl	Acide pur
0	2,15	2,1	2	2,15
2	2,35	2,25	2,1	
4	2,65	2,45	2,35	2,6
6	3,2	2,85	2,75	
7	3,95	3,4	3,35	3,9
7,2	4,35	3,75	3,65	
7,4	5	4,15	4,35	
7,6	5,95	4,85	5,05	
7,8	6,55	5,45	5,65	
8	7,15	5,95	6,15	
8,2	7,55	6,35	6,55	
8,4	8,15	7,05	7,25	
8,6	9,05	8,05	8,35	
8,8	9,45	8,75	8,85	9,25
9	9,75	9,25	9,45	9,55
9,4	10,35	9,95	10,05	
10	10,85	10,55	10,65	10,7

Ecart à pH 7,5 sodium : 1,20
potassium : 1

b) Composés organiques :

Avec ces composés, nous avons été obligés de réduire le nombre de points pris lors de chaque mesure, ceci afin de diminuer la durée de celle-ci, car l'hydrolyse aux pH alcalins est très rapide.

COCARBOXYLASE

Pour la Cocarboxylase et l'ATP, toutes les expériences que nous indiquons ont été réalisées dans la même journée à partir de la même solution. De ce fait, le contrôle de la stabilité n'a été effectué qu'une fois en fin de journée.

cm³ tétraméthyl-ammonium ajoutés	Acide pur	Acide + NaCl	Acide + KCl	Acide pur
0	2,65	2,65	2,75	
4	5,35	5,3	5,45	
6	6,45	6,35	6,4	
6,5	6,75	6,65	6,65	
7	7,05	6,85	6,85	
7,5	7,3	7,15	7,15	
7,8	7,55	7,45	7,4	
8	7,75	7,65	7,65	
8,2	8,15	8,1	8	
8,4	8,75	8,75	8,65	
8,6	9,4	9,35	9,15	
9	10,05	9,9	9,85	
9,5	10,55	10,35	10,45	
10	11	10,75	10,85	

Ecart à pH 7,5 sodium : 0,1
potassium : 0,15

cm³ tétraméthyl-ammonium ajoutés	Acide pur	Acide + NaCl	Acide + KCl	Acide pur
0	2,7	2,7	2,65	
4	5,5	5,4	5,45	
6	6,4	6,3	6,35	
6,5	6,6	6,55	6,6	
7	7,05	6,8	6,85	
7,5	7,35	7,15	7,15	
7,8	7,6	7,45	7,45	
8	7,8	7,55	7,65	
8,2	8,25	7,95	8,1	
8,4	9,1	8,6	8,7	
8,6	9,45	9,2	9,3	
9	10,1	9,8	9,9	
9,5	10,6	10,3	10,4	
10	10,95	10,6	10,8	

Ecart à pH 7,5 sodium : 0,15
potassium : 0,15

COCARBOXYLASE

cm³ tétraméthyl-ammonium ajoutés	Acide pur	Acide + NaCl	Acide + KCl	Acide pur	cm³ tétraméthyl-ammonium ajoutés	Acide pur	Acide + NaCl	Acide + KCl	Acide pur
0	2,65	2,7	2,7		0	2,7	2,65	2,75	2,75
4	5,4	5,45	5,45		4	5,5	5,35	5,4	5,55
6	6,1	6,25	6,3		6	6,5	6,35	6,35	6,55
6,5	6,8	6,6	6,6		6,5	6,75	6,6	6,6	6,8
7	7,05	6,85	6,85		7	7,05	6,75	6,8	7,05
7,5	7,35	7,1	7,15		7,5	7,25	7,05	7,1	7,25
7,8	7,6	7,4	7,45		7,8	7,55	7,35	7,35	7,55
8	7,85	7,65	7,65		8	7,8	7,55	7,55	7,75
8,2	8,25	8,05	8,1		8,2	8,25	7,95	7,95	8,1
8,4	9,05	8,85	8,85		8,4	8,9	8,6	8,45	8,75
8,6	9,5	9,35	9,4		8,6	9,45	9,1	9,15	9,2
9	10,05	9,85	9,95		9	10	9,6	9,6	9,9
9,5	10,65	10,35	10,45		9,5	10,5	10,2		
10	10,9	10,75	10,8		10	10,95	10,6	10,5	10,8
Ecart à pH 7,5		sodium : 0,2 potassium : 0,15			Ecart à pH 7,5		sodium : 0,2 potassium : 0,2		

ATP

cm^3 tétraméthyl-ammonium ajoutés	Acide pur	Acide + NaCl	Acide + KCl	Acide pur
0	3,3	3,2	3,2	
4	5,15	5,05	5,05	
6	6,55	6,3	6,3	
6,5	6,9	6,55	6,6	
7	7,15	6,85	6,85	
7,2	7,25	6,95	7	
7,4	7,4	7,1	7,15	
7,6	7,55	7,25	7,25	
7,8	7,75	7,4	7,4	
8	7,95	7,65	7,65	
8,2	8,25	8	7,95	
8,5	8,9	8,6	8,6	
9	9,8	9,55	9,6	
10	11	10,55	10,7	

Ecart à pH 7,5 sodium : 0,3
potassium : 0,3

cm^3 tétraméthyl-ammonium ajoutés	Acide pur	Acide + NaCl	Acide + KCl	Acide pur
0	3,2	3,25	3,25	
4	5,25	5,05	5,05	
6	6,55	6,25	6,3	
6,5	6,9	6,55		
7	7,15	6,85	6,85	
7,2	7,3	7	7	
7,4	7,4	7,1	7,15	
7,6	7,6	7,25	7,25	
7,8	7,75	7,45	7,45	
8	7,95	7,7	7,7	
8,2	8,25	8	8	
8,5	9	8,7	8,65	
9	9,85	9,6	9,6	
10	11	10,65	10,7	

Ecart à pH 7,5 sodium : 0,3
potassium : 0,25

ATP

cm^3 tétraméthyl-ammonium ajoutés	Acide pur	Acide + NaCl	Acide + KCl	Acide pur
0	3,25	3,25	3,25	
4	5,15	4,95	5	
6	6,5	6,15	6,25	
6,5	6,85	6,5	6,6	
7	7,1	6,75	6,85	
7,2	7,25	6,9	7	
7,4	7,35	7,05	7,15	
7,6	7,5	7,2	7,25	
7,8	7,65	7,35	7,45	
8	7,8	7,55	7,65	
8,2	8,15	7,8	8	
8,5	8,75	8,4	8,5	
9	9,7	9,45	9,45	
10	11	10,65	10,7	

Ecart à pH 7,5 sodium : 0,3
potassium : 0,25

cm^3 tétraméthyl-ammonium ajoutés	Acide pur	Acide + NaCl	Acide + KCl	Acide pur
0	3,3	3,25	3,25	3,25
4	5,15	4,95	5	5,1
6	6,5	6,15	6,25	6,5
6,5	6,85	6,5	6,55	6,8
7	7,1	6,75	6,85	7,05
7,2	7,25	6,95	6,95	7,2
7,4	7,35	7,05	7,1	7,35
7,6	7,5	7,2	7,2	
7,8	7,65	7,35	7,35	
8	7,8	7,5	7,55	7,55
8,2	8,1	7,75	7,8	7,8
8,5	8,65	8,35	8,3	
9	9,65	9,3	9,3	
10	11	10,6	10,6	11

Ecart à pH 7,5 sodium : 0,3
potassium : 0,3

E. A. P. P.

cm^3 tétraméthyl-ammonium ajoutés	Acide pur	Acide + NaCl	Acide + KCl	Acide pur
0	2,35	2,4	2,3	2,45
4	4,05	3,8	3,8	3,9
6	6,3	5,9	5,95	6,3
6,5	6,95	6,4	6,45	
7	7,4	6,8	6,9	7,3
7,4	7,95	7,15	7,25	
7,8	8,5	7,65	7,7	
8	8,95	8,05	8	8,9
8,5	9,6	8,85	8,75	
9	10,05	9,55	9,5	10,05
9,5	10,5	10 2	10,15	
10	11	10,6	10,55	11

Ecart à pH 7,5 sodium : 0,8
potassium : 0,7

6 atomes de P
T

cm^3 tétraméthyl-ammonium ajoutés	Acide pur	Acide + NaCl	Acide + KCl	Acide pur
0	2,35	2,3	2,45	2,45
4	3,95	3,8	3,7	4
6	6,35	5,95	5,95	6,15
6,5	6,9	6,4	6,5	6,9
7	7,4	6,75	6,9	7,4
7,4	7,95	7,15	7,35	7,95
7,8	8,5	7,55	7,75	8,5
8	8,85	7,95	8,15	8,9
8,5	9,55	8,75	8,8	
9	10,05	9,55	9,6	
9,5	10,45	10,15	10,25	
10	10,95	10,95	10,75	11

Ecart à pH 7,5 sodium : 0,8
potassium : 0, 6

6 atomes de P
T

E. A. P. P.

cm³ tétraméthyl-ammonium ajoutés	Acide pur	Acide + NaCl	Acide + KCl	Acide pur	cm³ tétraméthyl-ammonium ajoutés	Acide pur	Acide + NaCl	Acide + KCl	Acide pur
0	2,55	2,5	2,5	2,6	0	2,5	2,45	2,5	2,6
4	3,55	3,4	3,4	3,45	4	3,5	3,35	3,5	3,5
6	6	5,7	5,8	6,05	6	6,15	5,75	5,75	6,05
6,5	6,7	6,25	6,25	6,65	6,5	6,75	6,25	6,3	6,65
7	7,15	6,65	6 65	7,1	7	7,1	6,55	6,7	7,1
7,5	7,7	7	7,05	7,65	7,5	7,6	6,9	7,05	
7,8	8,05	7,35	7,35		7,8	8,1	7,25	7,4	
8	8,45	7,55	7,65	8,4	8	8,45	7,55	7,75	8,3
8,5	9,1	8,2	8,2	9 05	8,5	9,15	8,05	8,25	9,05
9	9,9	9,15	9,05		9	9,9	9,15	9,15	
9,5	10,4	9,95	9,85		9,5	10,4	9,8	9,9	
10	10,9	10,5	10,5		10	10,9	10,5	10,55	
Ecart à pH 7,5		sodium : 0,7 potassium : 0.65			Ecart à pH 7,5		sodium : 0,7 potassium : 0,55		
4 atomes de P T					4 atomes de P T				

Nous donnons les courbes de neutralisation dressées en opérant comme nous venons de l'indiquer. Les courbes de la figure 1 sont obtenues avec l'acide phosphorique pur, puis après addition de Na Cl $\frac{M}{6}$ et enfin de K Cl $\frac{M}{6}$. Les figures 2, 3, 4, 5 et 6 représentent les courbes obtenues dans les mêmes conditions respectivement avec l'acide tripolyphosphorique, les acides polyphosphoriques, l'ATP, la cocarboxylase et les E.A.P.P.

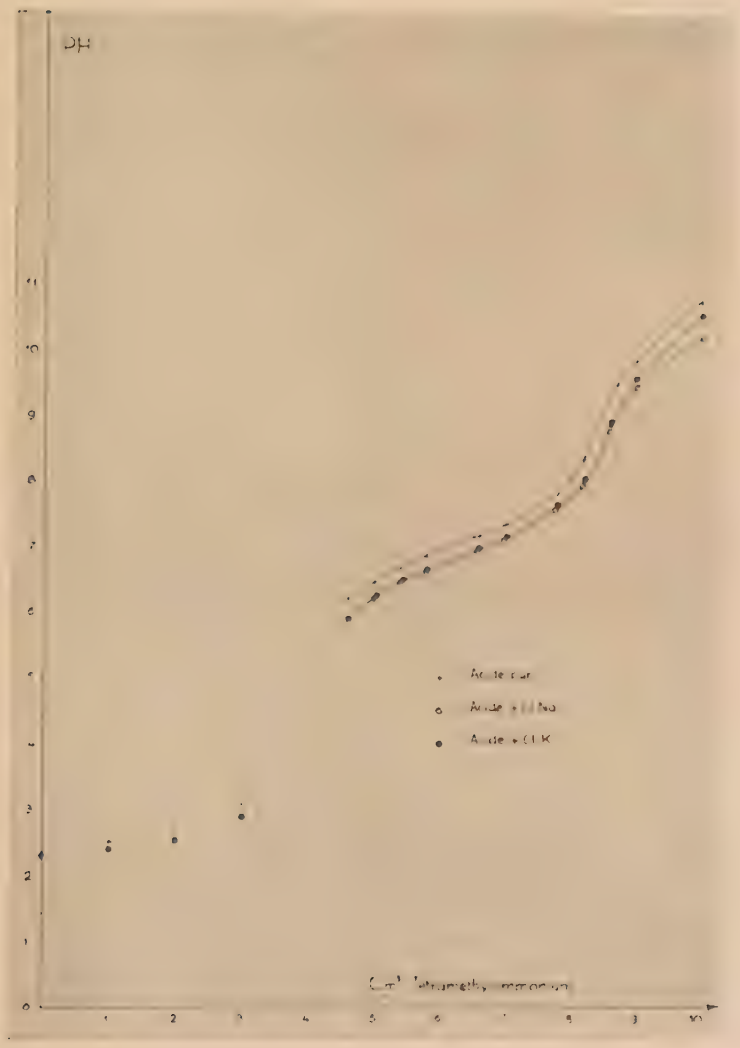


Figure 1. — Courbes de neutralisation de l'acide ortophosphorique en présence ou non de chlorure de sodium ou de chlorure de potassium.

Figure 2. — Courbes de neutralisation de l'acide tripolyphosphorique en présence ou non de chlorure de sodium ou de chlorure de potassium.

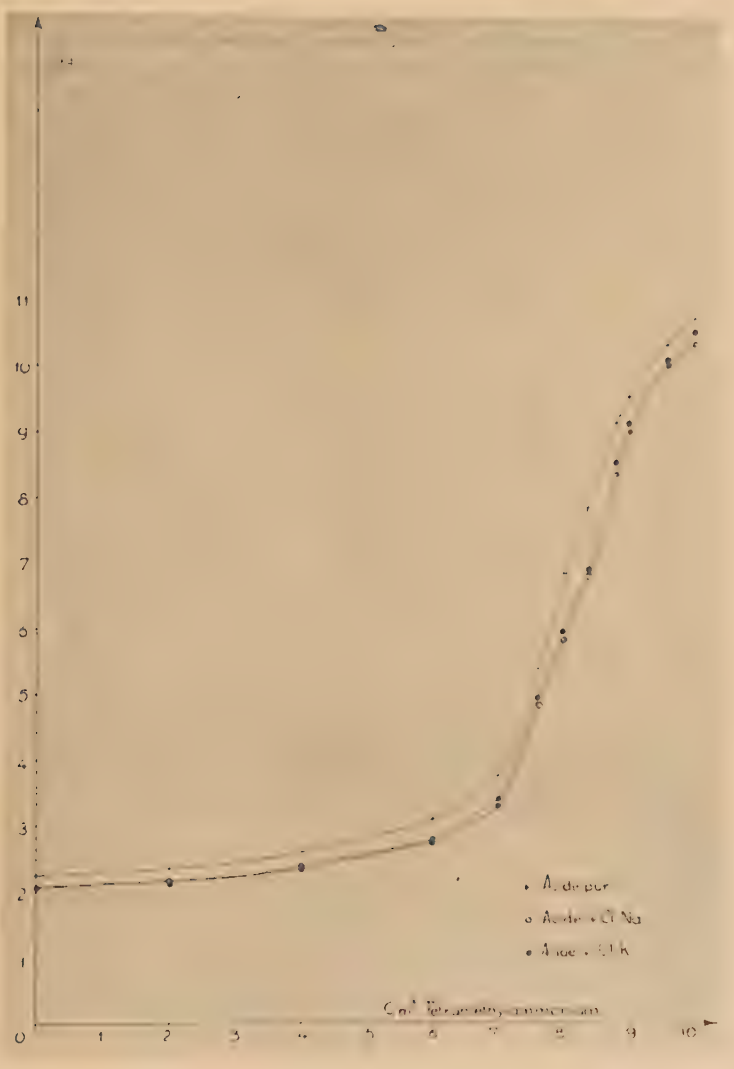


Figure 3. — Courbes de neutralisation des acides polyphosphoriques en présence ou non de chlorure de sodium ou de chlorure de potassium.

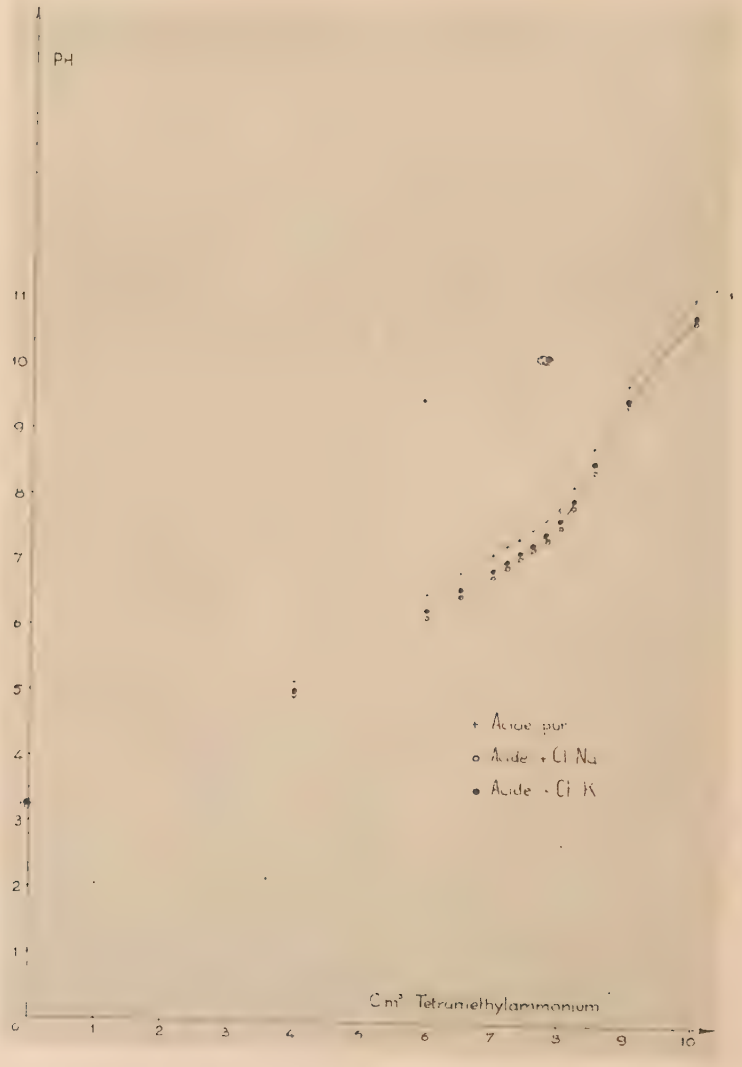


Figure 4. — Courbes de neutralisation de l'ATP en présence ou non de chlorure de sodium ou de chlorure de potassium.

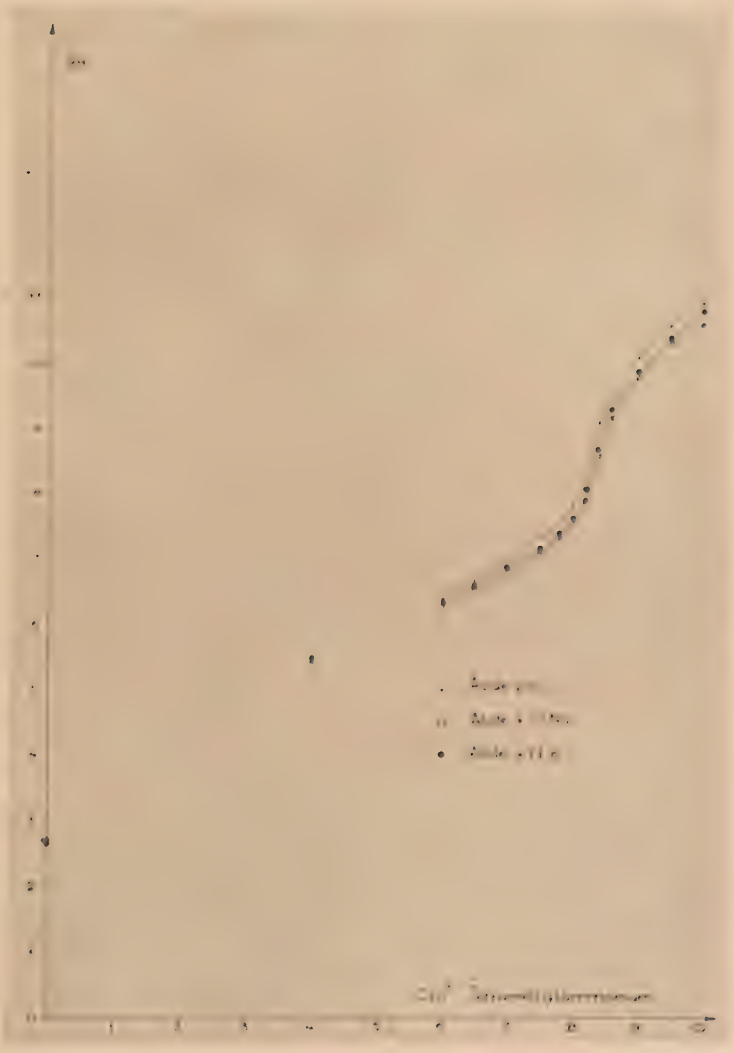


Figure 5. — Courbes de neutralisation de la cocarboxylase en présence ou non de chlorure de sodium ou de chlorure de potassium.

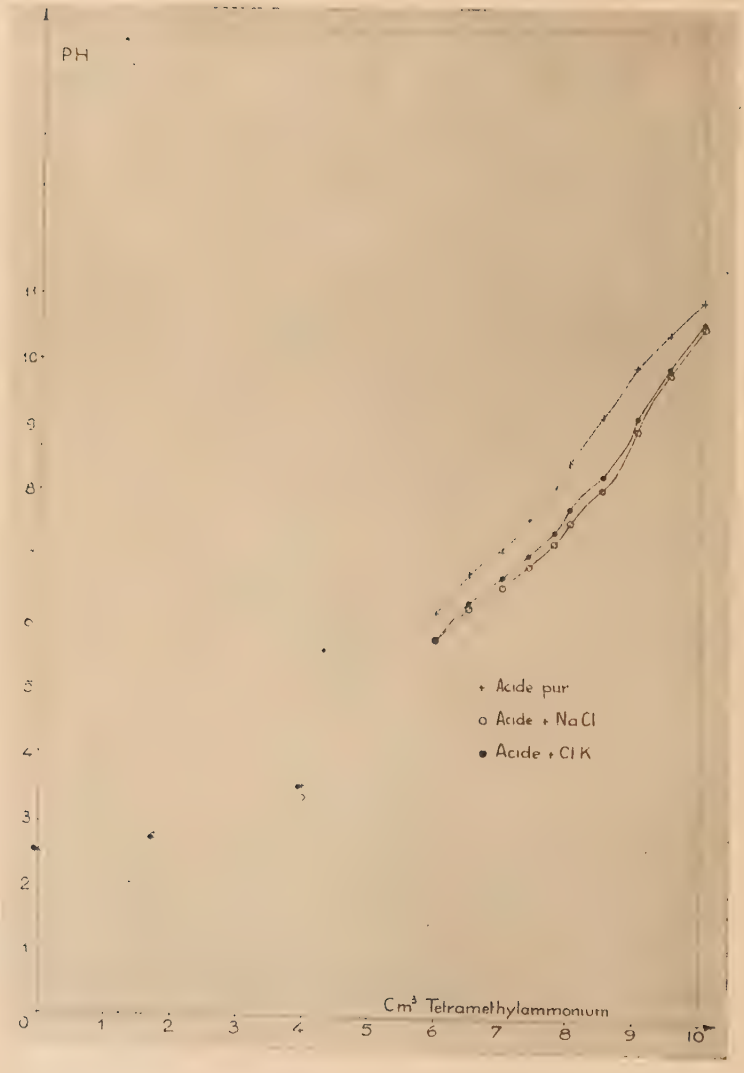


Figure 6. — Courbes de neutralisation des E.A.P.P. en présence ou non de chlorure de sodium ou de chlorure de potassium.

Un simple examen de ces courbes montre que, quel que soit le composé polyphosphorique étudié, l'addition d'ions sodium ou potassium entraîne une acidification de la solution. Ainsi donc, pour la même solution d'acide polyphosphorique, à quantité égale d'hydroxyde de tétraméthylammonium ajoutée, la solution additionnée de chlorure de sodium ou de potassium est plus acide que la solution pure. Cet écart de pH est d'autant plus grand que la chaîne polyphosphorique est plus longue ainsi qu'il apparaît à l'examen des courbes obtenues avec les divers composés polyphosphoriques étudiés.

Les plus grands écarts obtenus avec les acides polyphosphoriques et les E.A.P.P. sont de l'ordre de l'unité de pH.

Nous donnons ci-après un tableau récapitulatif dans lequel nous portons les écarts maximum relevés au voisinage de pH 7,5.

Acide étudié	Ecart avec Na^+	Ecart avec K^+
Orthophosphorique	0,25	0,25
Tripolyphosphorique	0,65	0,65
Polyphosphoriques	1,25	1,25
Cocarboxylase	0,2	0,2
ATP	0,30	0,30
E. A. P. P.	0,80	0,70

§ 3. — VERIFICATIONS

Nous avons effectué deux types d'expériences de vérifications :

a) Nous avons procédé à une neutralisation d'acides polyphosphoriques d'abord purs, puis en présence de chlorure de sodium et enfin en présence de nitrate de sodium.

cm^3 tétraméthylammonium ajoutés	Acide pur	Acide + NaCl	Acide + $Na NO_3$
0	2,25	2,1	2,25
4	2,7	2,5	2,55
6	3,15	2,8	2,9
7	3,55	3,1	3,2
7,5	3,95	3,3	3,4
8	4,45	3,75	3,8
8,5	6,45	5,55	5,65
9	8	6,8	6,8
9,5	9,7	9,15	9,25
10	10,75	10,45	10,45

Ecart en présence de NaCl : 1,2

à pH 7,5

Ecart en présence de $NaNO_3$: 1,2

Donc l'abaissement du pH est bien le fait du cation.

b) Nous avons ensuite procédé à la neutralisation d'une solution d'acide acétique : d'abord pure, puis en présence de chlorure de sodium et enfin en présence de chlorure de potassium.

Les résultats sont les suivants :

cm³ tétraméthyl-ammonium	Acide pur	Acide + NaCl	Acide + KCl	cm³ tétraméthyl-ammonium	Acide pur	Acide + NaCl	Acide + KCl	Acide pur
0	3,3	3,25	3,2	0	3,25	3,25	3,25	3,25
4	4,45	4,45	4,35	4	4,45	4,45	4,45	4,45
6	4,75	4,75	4,65	6	4,75	4,75	4,75	4,75
8	5	5	4,95	8	5,05	5	5	
10	5,35	5,35	5,3	10	5,35	5,35	5,35	5,35
11	5,55	5,55	5,55	11	5,55	5,55	5,55	
12	5,95	5,95	5,9	12	5,95	5,9	5 9	5.95
12,2	6.05	6,05	6,05	12,2	6,05	6 05	6.05	
12,4	6,25	6,25	6 25	12.4	6,25	6.25	6,25	
12,6	6 45	6.55	6,45	12.6	6,45	6,45	6,45	6,45
12,8	6 75	6 85	6,85	12.8	6,85	6.85	6,85	6,8
13,2	9,25	9,3	9.3	13	7,65	7,80	7,65	7.65
14	10,55	10,3	10,55	14	10,65	10,65	10,65	

à pH 7,5

Ecart avec Na^+ = 0

Ecart avec K^+ = 0

c) Enfin dernier contrôle, nous avons réalisé la même série d'expériences avec une solution d'acide chlorhydrique.

cm³ tétraméthyl-ammonium	Acide pur	Acide + NaCl	Acide + KCl
0	2,2	2,2	2,2
0,5	2,2	2,2	2,25
1	2,3	2,3	2,3
1,5	2,35	2,4	2,35
2	2,4	2,4	2,4
2,5	2,5	2,5	2,55
3	2,6	2,6	2,65
3,5	2,75	2,75	2,8
4	2,95	2,95	3
4,5	3,35	3,4	3,45
5	6	6	6
6	11,1	10,9	11,1

B. — POLAROGRAPHIE

Lors de l'exposé rapide de la théorie de cette méthode, nous avons déjà esquissé les difficultés qui nous attendaient. Elles sont de trois ordres :

— Choix de l'électrolyte support ;

— Obligation d'opérer à un pH légèrement supérieur à 7 ;

— Obligation d'opérer avec des produits très purs sous peine de voir le courant résiduel devenir trop important.

§ I. — CHOIX DE L'ELECTROLYTE SUPPORT ET DES CONDITIONS EXPERIMENTALES

Nous avons tout d'abord essayé d'opérer avec de l'hydroxyde de tétraméthylammonium à la concentration 0,1 N recommandée par Kolthoff (44). L'utilisation de ce produit offrait certes un avantage, celui de porter le pH à des valeurs très élevées, ce qui rendait impossible la décharge de l'hydrogène. Mais, en contre-partie, les inconvénients étaient très nombreux. Tout d'abord, l'extrême impureté du produit qui nous était livré provoquait un courant résiduel prohibitif.

En outre, les pH alcalins qui étaient atteints nous laissaient prévoir qu'aucun des composés organiques que nous désirions polarographier ne pourraient résister suffisamment longtemps pour permettre leur étude. Nous avons donc été amenés à utiliser l'iodure de tétraméthylammonium qui permettait d'opérer à un pH voisin de 7. Là encore, les difficultés furent nombreuses

car les premiers envois dont nous disposions étaient d'une pureté très relative et les polarogrammes à blanc obtenus avec eux montraient un courant résiduel intense (figure 7).

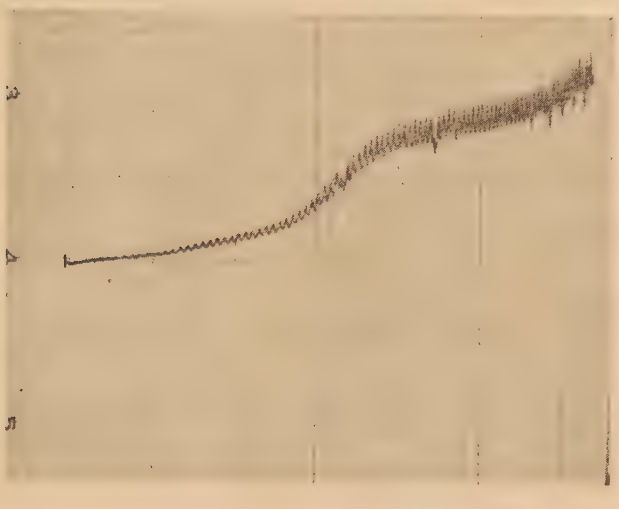


Figure 7. — Courant résiduel fourni par un iodure de tétraméthylammonium impur.

Nous avons alors essayé des purifications par cristallisation à froid, mais les essais ne furent guère concluants.

Le seul produit qui nous donna finalement satisfaction fut l'iodure de tétraméthylammonium de la Firme Merck. Le courant résiduel obtenu avec des solutions de ce sel est en effet négligeable (figure 8). Dès lors, c'est ce produit que nous avons

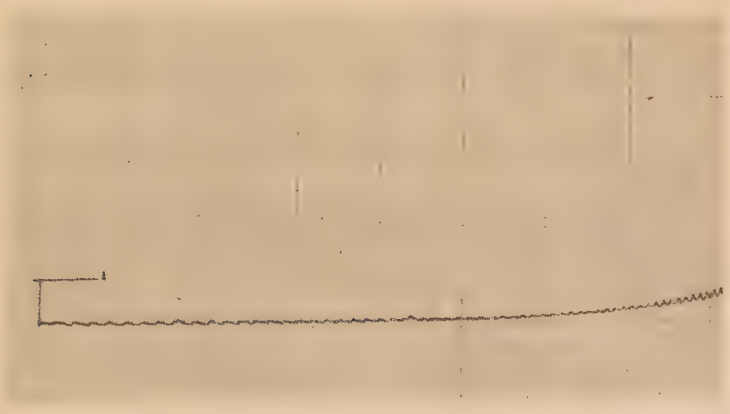


Figure 8. — Courant résiduel fourni par l'iodure de tétraméthylammonium Merck.

employé. Nous préparons une solution $\frac{M}{5}$ chaque jour, soit 2,010 g. pour 100 cm³. Et avant chaque série d'expériences, nous effectuons un polarogramme à blanc avec la solution suivante :

5 cm³ solution $\frac{M}{5}$ auxquels on ajoute

5 cm³ isopropanol redistillé.

Nous pouvions dès lors passer à l'étude polarographique du sodium. Notre premier but fut évidemment de réaliser des mesures quantitatives précises avec ce cation.

Remarquons à ce sujet qu'il convient de noter une cause d'erreur supplémentaire. Malgré la présence du joint en agar-agar et de la plaque de verre fritté, la diffusion du potassium de l'électrode de référence vers le compartiment où se trouve la solution étudiée est inévitable. Le potentiel de demi-palier du potassium est — 2,10 volts, celui du sodium — 2,07 volts (KOLTHOFF), c'est dire que leur distinction polarographique est impossible et si du potassium se trouve mêlé à la solution de sodium, on n'observera qu'une seule vague cumulant les effets de ces deux ions. A titre d'exemple nous donnons les deux courbes de la figure 9.

Figure 9. — Diffusion de l'ion K^+ à partir de l'électrode de référence.

A gauche : Eau distillée après un séjour de plusieurs heures dans la cellule.

A droite : Eau distillée après un séjour de 15 minutes.

La première est réalisée avec de l'eau distillée ayant séjourné plusieurs heures dans la cellule. La deuxième avec de l'eau distillée y ayant séjourné 15 minutes au maximum. On voit que si le séjour de la solution étudiée dans l'appareil est assez bref, la contamination par le potassium est négligeable. Mais de toute manière, un rinçage très soigné de la cellule est nécessaire avant chaque expérience. Nous avons donc été amenés à adopter le mode opératoire suivant :

a) rincer très soigneusement la cellule et l'extérieur du tube capillaire avec de l'eau distillée,

b) rincer avec la solution étudiée,

c) remplir la cellule avec la dite solution et ouvrir l'arrivée d'azote R,

d) dégazer pendant 10 minutes exactement. Nous avons choisi ce temps de 10 minutes pour deux raisons :

— au bout de ce temps la désoxygénation est complète.

— même si du potassium diffuse dans notre solution, son apport à la hauteur de vague pourra être négligé car cette participation sera la même pour toutes les expériences, en effet la durée de diffusion, et donc la quantité de potassium ayant pénétré, est la même pour toutes les expériences.

e) A la 10e minute exactement, commencer l'enregistrement qui est effectué entre — 1,6 et — 2,4 volts.

La hauteur de vague, c'est-à-dire la valeur du courant de diffusion id, est déterminée comme indiqué sur la figure 10.

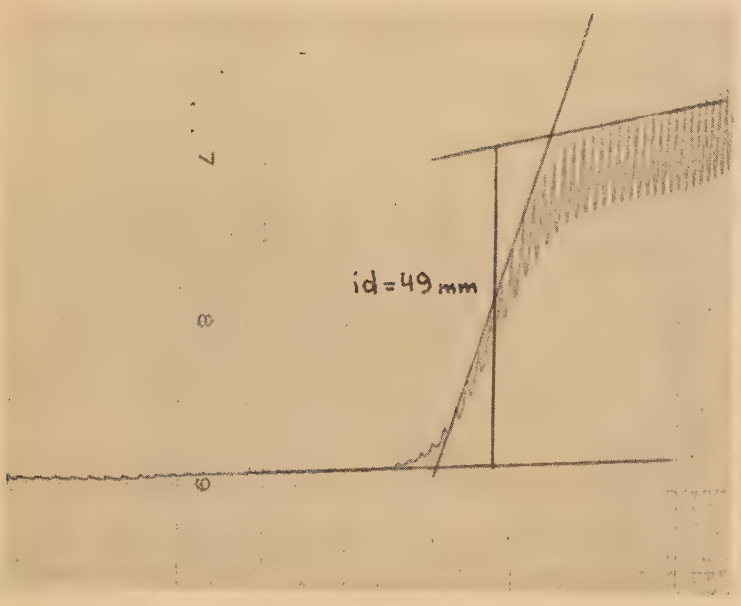


Figure 10. — Mesure du courant de diffusion.

Pendant toute la durée du dégazage et de l'enregistrement, la cellule plonge dans un bain à la température constante de 23°.

§ II. — DETERMINATION QUANTITATIVE DU SODIUM

Pour ce faire, il était nécessaire d'avoir une solution de concentration connue en ions sodium et dont le pH était légèrement supérieur à 7.

Nous avons procédé ainsi :

On dissout 10,6 g. de $Na_2 CO_3$ anhydre dans 100 cm^3 d'eau soit M : solution que nous appellerons « solution mère ». Puis :

10 cm^3 exactement mesurés de solution mère sont portés à pH 7,7 avec du HCl $\frac{N}{2}$ — et enfin ce mélange est porté à 200 cm^3 exactement.

1 cm^3 de cette solution contient 23.10^{-4} g. de sodium, soit $\frac{Na}{10}$.

En outre :

10 cm³ de solution mère sont portés à pH 7,7 avec du HCl $\frac{N}{2}$ — et on amène le mélange à 100 cm³ exactement.

1 cm³ de cette solution contient 46.10^{-4} g. de sodium, soit $\frac{Na}{5}$.

Nous sommes ainsi en possession des deux solutions qui vont nous permettre de tracer une courbe d'étalonnage de l'appareil pour le sodium. Il est bien évident que cette courbe ne sera valable que tout autant que les conditions d'expérience seront constantes, à savoir : même cellule, même électrode de référence, même tube capillaire et même température.

Kolthoff (44) recommande d'opérer en milieu alcoolique pour avoir des vagues mieux développées. Nous avons donc expérimenté en milieu isopropanol à 40 p. cent environ. L'alcool isopropylique utilisé était redistillé deux fois par nos soins.

Nous préparons les solutions de la manière suivante : à x cm³ de solution $\frac{Na}{5}$ ou $\frac{Na}{10}$, nous ajoutons $(1 - x)$ cm³ H_2O, puis 4 cm³ d'isopropanol et enfin 5 cm³ de solution d'iodure de tétraméthylammonium $\frac{M}{5}$.

Nous avons ainsi utilisé des solutions contenant respectivement par cm³ : 23 µg, 31 µg, 46 µg, 61 µg, 92 µg.

Les enregistrements ont été effectués selon la technique indiquée p. 66. Nous avons fixé la sensibilité de l'appareil sur la position Id 20, la valeur du filtrage à la position 1, la hauteur de charge du mercure étant la position 2 de l'échelle graduée.

Nous avons obtenu les résultats suivants :

Quantité Na^+ µg/cm³	23	31	46	61	92
id mm	25	33,5	49	67	104
	24	32,5	50,5	68,5	102,5

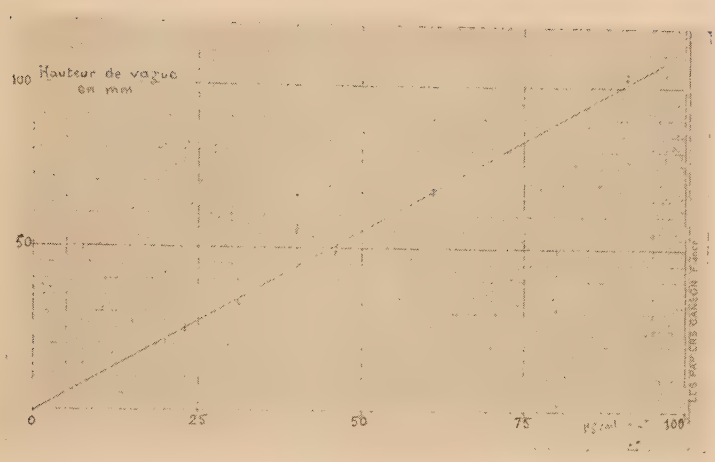


Figure 11. — Courbe d'étalonnage pour le sodium.

La courbe tracée avec ces chiffres est une droite (figure 11). Des contrôles ont été effectués avec des solutions de concentrations diverses en sodium. Pour des valeurs inférieures à 150 μg par cm^3 en sodium, la précision est de l'ordre de 2 p. cent.

Ainsi, une solution contenant 69 μg par cm^3 en sodium donne comme hauteur de vague 75 mm, soit par report à la courbe, environ 67,5 μg par cm^3.

§ III. — VAGUE DONNEE PAR LA THIAMINE ET DIVERS COMPOSES POLYPHOSPHORIQUES

Après avoir mis au point la détermination quantitative du sodium, nous commençâmes l'étude de la liaison du sodium par les E.A.P.P.

Dès les premières expériences, notre attention fut attirée par la valeur importante que prenait le courant résiduel.

Nous avons alors renforcé toutes les précautions destinées à limiter ce courant au maximum et malgré cela, il persistait systématiquement. La signification s'imposait bientôt à nous à la lumière des nombreux travaux antérieurs relatifs à l'aneurine (45, 46, 47, 48).

L'aneurine donne en effet une vague polarographique aux environs de — 1,3 volts, ce potentiel variant avec de nombreux facteurs dont le pH, la concentration.

Nous n'avons trouvé aucune référence quant à la polarographie des esters phosphoriques de la thiamine, notre attention

a été seulement retenue par un résultat important de Von Muralt qui signale que les extraits de nerfs cholinergiques stimulés donnent une vague polarographique à — 1,9 volts environ ; il attribue cette vague à un composé non défini de la thiamine (49).

Une étude plus approfondie des vagues fournies par les composés organiques que nous utilisions s'imposait. Comme nous l'avons indiqué, le potentiel de demi-palier de la thiamine est variable avec les conditions de l'expérience.

Il fallait donc que nous déterminions les vagues données par l'aneurine, la cocarboxylase et les E.A.P.P. dans les conditions de notre utilisation, c'est-à-dire à pH 7,1, en présence de sodium, en milieu isopropanol et en présence d'iodure de tétraméthylammonium. Il est bien évident que dans ce cas, l'emploi d'iodure de tétraméthylammonium n'a pas pour but de supprimer la composante de migration du courant limite puisque avec ces molécules non chargées, cette composante est nulle. Nous employons donc l'iodure de tétraméthylammonium uniquement pour nous replacer dans les mêmes conditions que lors de l'étude du sodium.

a) *Thiamine :*

On part d'une solution de dichlorhydrate d'aneurine $\frac{M}{30}$ environ. Cette solution a un pH nettement acide. On ramène ce pH à 7,1 par l'addition d'une solution de $Na_2 CO_3$ anhydre. Puis, on effectue un enregistrement selon la technique habituelle avec la solution suivante : à 0,2 cm^3 de solution de thiamine on ajoute 4,8 cm^3 d'isopropanol et 5 cm^3 d'iodure de tétraméthylammonium $\frac{M}{5}$, c'est-à dire environ 200 μg par cm^3 de thiamine.

L'examen de la courbe obtenue montre un maximum très prononcé (figure 12). On ajoute alors à la solution quelques centigrammes de gélatine qui ont pour effet d'éliminer les maxima et dorénavant toutes les courbes tracées avec la thiamine pure sont réalisées en présence de gélatine (figure 13).

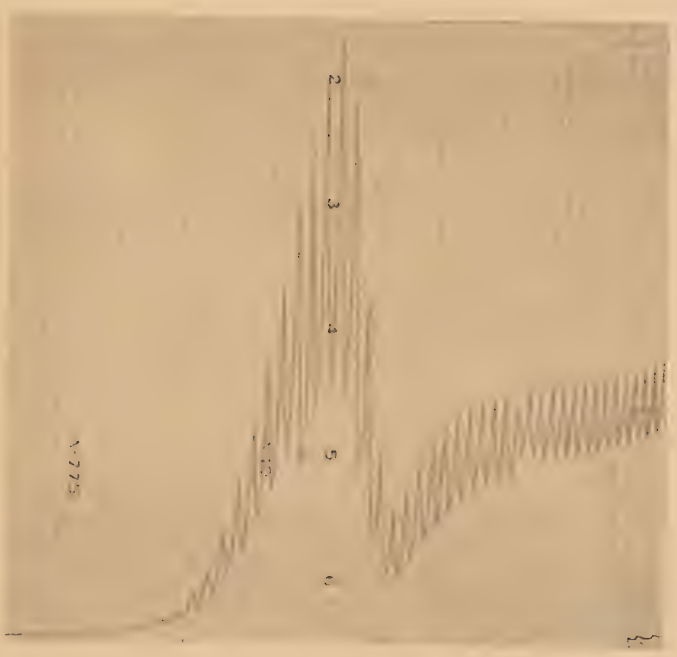


Figure 12. — Maximum donné par la thiamine.

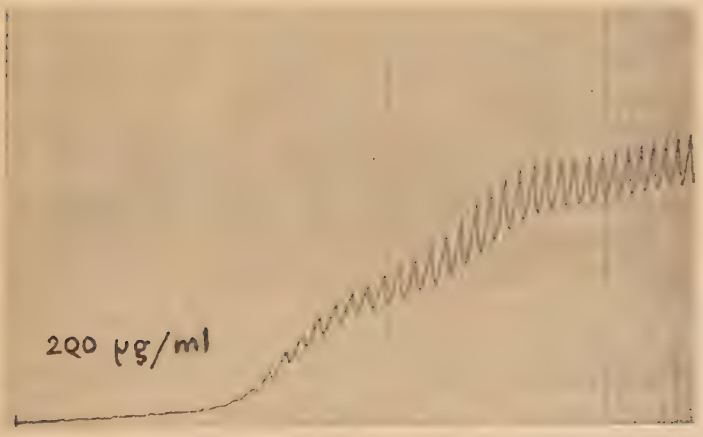


Figure 13. — Suppression du maximum par l'addition de gélatine.

Puis on trace des enregistrements avec des solutions contenant respectivement environ 400 µg et 600 µg par cm^3 d'aneurine. Ces polarogrammes sont effectués en polarographie directe avec Id 7 et en dérivée avec Id 2 (figure 14).

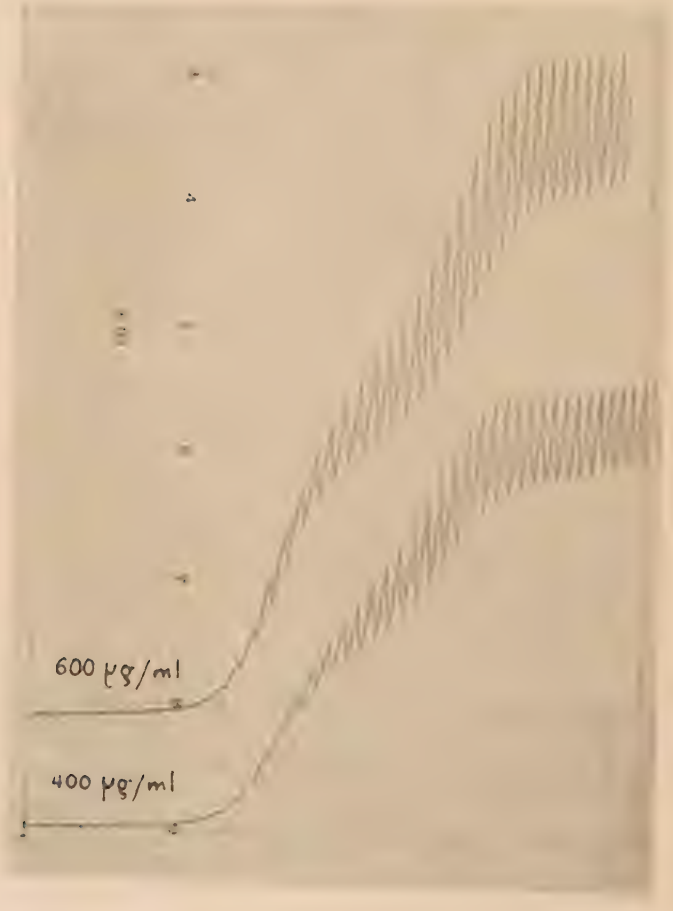


Figure 14. — Courbes obtenues avec diverses concentrations en Thiamine.

On voit ainsi que dans les conditions où nous opérons, la thiamine fournit deux vagues : la première à —1,3 volts environ, la deuxième à — 1.55 volts environ. Ces potentiels de demi-palier semblent d'ailleurs se déplacer légèrement en fonction de la concentration.

Concentration µg/cm³	E ½ 1er palier	E ½ 2e palier
200	— 1,30	— 1,54
400	— 1,31	— 1,56
600	— 1,32	— 1,58

b) *Cocarboxylase :*

Nous préparons une solution de cocarboxylase Roche $\frac{M}{135}$ environ. Nous la portons à pH 7,1 à l'aide d'une solution de $Na_2 CO_3$ anhydre. Puis nous réalisons des enregistrements avec la solution suivante :

A 1 cm³ de solution, nous ajoutons 4 cm³ d'isopropanol, puis 5 cm³ de solution d'iodure de tétraméthylammonium $\frac{M}{5}$. Soit environ 355 µg par cm³ (figure 15).

Nous utilisons ensuite des solutions contenant respectivement 177 µg par cm³ et 532 µg par cm³. Les enregistrements sont effectués en polarographie directe avec Id 7 et dérivée avec Id 2.

La cocarboxylase donne donc une seule vague à environ —1,55 volts. La concentration paraît influer légèrement sur la position de cette vague comme le montre le tableau suivant :

Concentration en µg/cm³	E ½
177	— 1,55
355	— 1,56
532	— 1,57

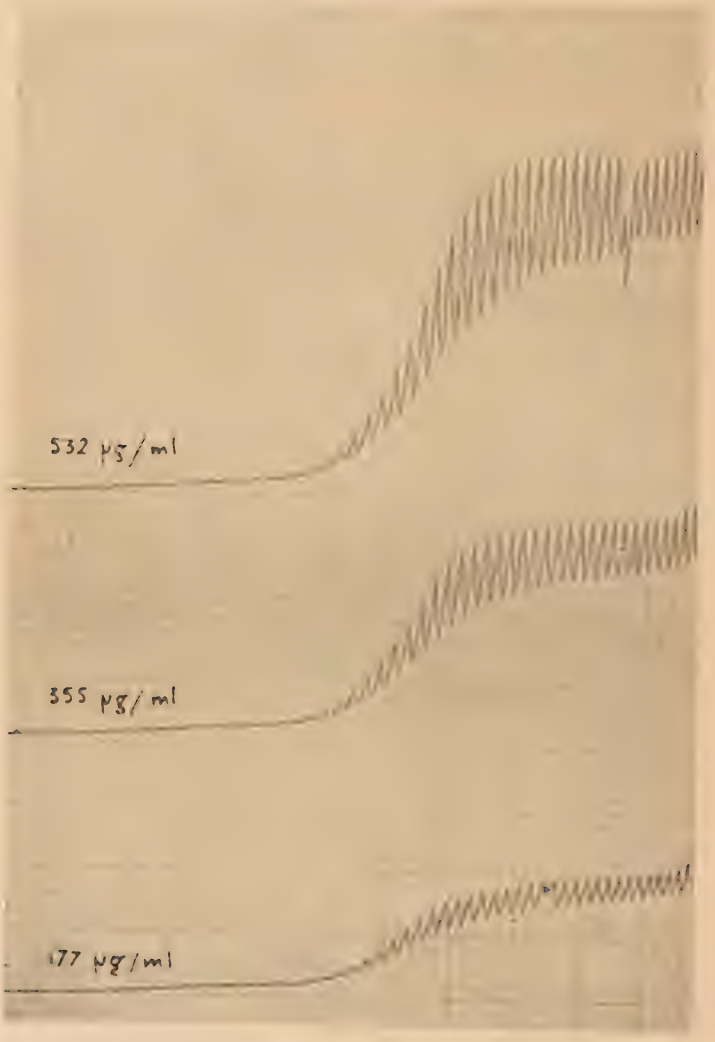


Figure 15. — Courbes obtenues avec diverses concentrations en Cocarboxylase.

c) *E.A.P.P.*

Pour les E.A.P.P., nous avons utilisé les produits obtenus par recristallisation comme indiqué dans la technique décrite p. 28, c'est-à-dire solution R_0, solution R_1.

Dans ce cas, nous ne pouvions pas exprimer les concentrations en grammes d'E.A.P.P./cm³ car le poids moléculaire de

ces composés nous échappait. Nous avons donc rapporté nos solutions à leur concentration en thiamine.

Nous avons ainsi opéré dans les mêmes conditions que celles ci-dessus indiquées avec des solutions contenant respectivement environ 160 $\mu g/cm^3$, 240 $\mu g/cm^3$, 320 $\mu g/cm^3$ de thiamine sous forme E.A.P.P.

L'examen des figures nous montre que la molécule d'E.A.P.P donne en polarographie dérivée un sommet parfaitement défini à environ —1,55 volts. Ce sommet varie légèrement avec la concentration comme l'indique le tableau ci-dessous :

Concentration exprimée en $\mu g/cm^3$ de thiamine		E ½
R_0 à 13 atomes de phosphore	160	— 1,53
	240	— 1,54
	320	— 1,56

Les enregistrements ont été effectués comme d'habitude avec Id 7 pour la polarographie directe et Id 2 pour la polarographie dérivée.

Outre cette décharge bien définie à —1,55 volts, les enregistrements montrent que, aux environs de —1,90 volts, on enregistre une augmentation du courant de diffusion tant en polarographie directe que dérivée, augmentation qui se traduit par une vague mal définie et peu interprétable, du fait sans doute, que la décharge du sodium suit de très près et est très intense vu la forte concentration relative de cet ion (figure 16-17).

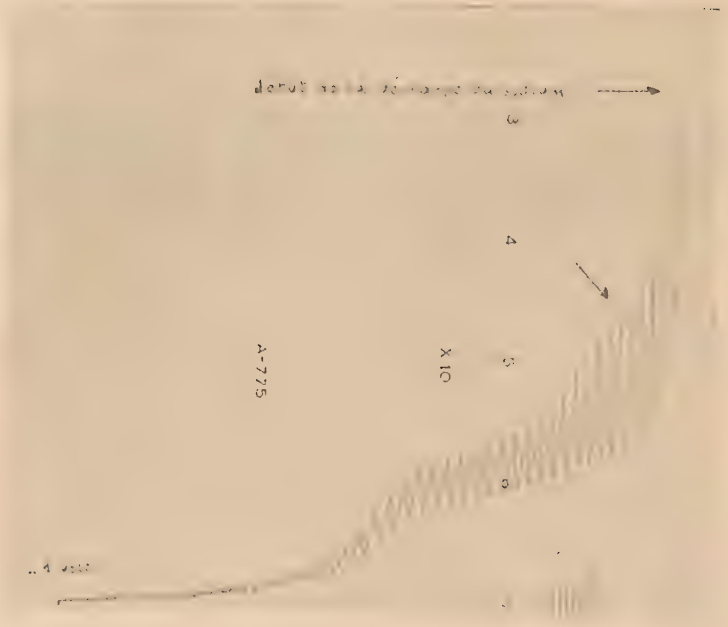


Figure 16. — Courbe obtenue en polarographie directe avec les E.A.P.P.

Figure 17. — Courbe obtenue en polarographie dérivée avec les E.A.P.P.

§ IV. — DISSIMULATION D'IONS SODIUM ET POTASSIUM EN PRESENCE D'ACIDES POLYPHOSPHORIQUES MINERAUX ET ORGANIQUES

I. — Mode opératoire

Il résultait de nos expériences préliminaires, dont nous venons d'exposer les résultats, que nous allions aborder la partie expérimentale princeps de notre travail, prévenus du fait que nous devions nous soumettre à deux conditions contraires :

— d'une part, il était nécessaire d'utiliser des concentrations relativement élevées en E.A.P.P. pour rendre le phénomène parfaitement visible,

— d'autre part, des concentrations trop fortes en polyphosphates organiques augmentaient le courant résiduel dans des proportions telles que les courbes devenaient ininterprétables.

Nous avons heureusement pu nous placer dans des conditions expérimentales qui nous permettaient de satisfaire à ces deux exigences contraires. C'est ainsi que nous avons finalement adopté le protocole expérimental suivant :

On détermine la quantité de « liqueur acide » d'E.A.P.P. qui amène 1 cm^3 d'une solution de $Na_2 CO_3$ anhydre $\frac{M}{10}$ — à pH 7,1.

Puis on porte 10 fois cette quantité dans un récipient convenable et on ajoute goutte à goutte à la burette en agitant constamment, 10 cm^3 de la solution de $Na_2 CO_3$. Le pH doit être de 7,1. S'il est légèrement supérieur, on ajoute la quantité nécessaire de liqueur acide pour le ramener à cette valeur.

On rince alors les électrodes du pHmètre en recueillant le liquide de rinçage dans le récipient contenant la solution à pH 7,1. On porte alors le tout à 50 cm^3 exactement.

On obtient ainsi ce que nous appellerons « la solution P ».

Cette solution contient 92.10^{-5} g par cm^3 de sodium.

On trace alors un polarogramme avec la solution suivante : à 1 cm^3 de solution « P », on ajoute 4 cm^3 d'isopropanol et 5 cm^3 de solution d'iodure de tétraméthylammonium $\frac{M}{5}$.

Cette solution contient 92 µg par cm^3 de sodium. L'enregistrement est effectué avec : Id 30, filtre 1, hauteur de charge du mercure : graduation 2 de l'échelle.

On prépare alors la solution témoin. Les opérations sont rigoureusement les mêmes, mais la liqueur acide est remplacée par de l'acide chlorhydrique $\frac{N}{2}$. Comme les enregistrements de la solution et de son témoin sont effectués dans un court intervalle de temps, il n'est plus nécessaire de plonger la cellule dans un bain-marie à température constante.

On obtient ainsi deux courbes : la première avec les E.A.P.P., la deuxième en l'absence de ces composés. La différence des courants de diffusion nous fournit la quantité de sodium ionique ayant disparu.

L'étude de la disparition de l'ion potassium s'est poursuivie parallèlement à celle du sodium et rigoureusement de la même manière, en utilisant une solution de K_2CO_3 à 1,38 g. p. cent et dans ces conditions, la solution « P » contient 156.10^{-5} g. par cm^3 de potassium.

C'est ainsi que nous avons procédé à l'étude non seulement des E.A.P.P., mais encore des acides orthophosphorique, pyrophosphorique, tripolyphosphorique, polyphosphoriques (sel de Graham), trimétaphosphorique, de la cocarboxylase et enfin de l'ATP.

II. — Résultats obtenus

RÉSULTATS OBTENUS AVEC LE SODIUM

a) *Acide orthophosphorique :* nous préparons une solution stock d'acide phosphorique avec 2 cm^3 de l'acide R.P. portés à 250 cm^3 avec de l'eau distillée.

Puis, selon le protocole indiqué ci-dessus, nous préparons deux solutions « P » : P_1 et P_2 et les deux témoins de ces solutions avec de l'HCl. Pour chaque solution, nous traçons deux courbes selon la technique décrite page 66. Nous avons ainsi en répétant chaque expérience la succession suivante d'enregistrements.

Première expérience :

Solution P_1 et son témoin puis Solution P_2 et son témoin

Deuxième expérience :

Solution P_1 et son témoin puis Solution P_2 et son témoin

Les résultats obtenus sont les suivants :

	i_d Solution "P" mm	i_d Témoin mm	Différence	% ion sodium disparu
Solution P_1	78	78	0	0
	78	78	0	0
Solution P_2	77,5	77	0	0
	77,5	77	0	0

Figure 18. — Acide orthophosphorique.

b) *Acide pyrophosphorique :* La solution d'acide pyrophosphorique est préparée selon la technique exposée page 25. Puis, à partir de cette solution, nous préparons les 2 solutions P_1 et P_2 et leurs 2 témoins.

En répétant chaque expérience, nous traçons la succession d'enregistrements :

Première expérience :

Solution P_1 et son témoin puis Solution P_2 et son témoin

Deuxième expérience :

Solution P_1 et son témoin puis Solution P_2 et son témoin

Les résultats obtenus sont les suivants :

	i Sol. "P" mm	i_d Témoin mm	Différence	% ion Na disparu
Solution P_1	74,5	74,5	0	0
	74,5	74,5	0	0
Solution P_2	74,5	74,5	0	0
	74,5	74,5	0	0

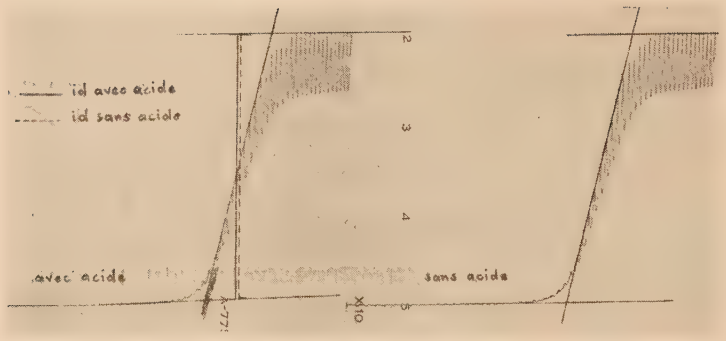


Figure 19. — Acide pyrophosphorique.

c) *Acide tripolyphosphorique :* On prépare une solution d'acide tripolyphosphorique selon la technique de la page 25. A partir de cette solution, on prépare P_1 et P_2 et leurs deux témoins.

On réalise alors, une nouvelle préparation d'acide tripolyphosphorique, qui nous permet d'obtenir les solutions P_3, P_4 et leurs témoins. On trace alors la succession des courbes :

Première expérience :

Solution P_1 et témoin puis Solution P_2 et témoin

Deuxième expérience :

Solution P_1 et témoin puis Solution P_2 et témoin

Troisième expérience :

Solution P_3 et témoin puis Solution P_4 et témoin

Quatrième expérience :

Solution P_3 et témoin puis Solution P_4 et témoin

Les préparations sont réalisées à 24 heures d'intervalle et nous refaisons chaque jour la solution de $Na_2 CO_3$.

Les solutions P_1, P_2 et leurs témoins, les solutions P_3, P_4 et leurs témoins sont donc polarographiées à 24 heures d'intervalle et préparées chacune avec des solutions de carbonate de sodium différentes ; il ne faut donc pas s'étonner si l'on trouve de très légères différences entre les premiers témoins et les seconds.

		i_d Sol. "P" mm	i_d Témoin mm	Différence	% ion Na disparu
1re préparation	Solution P_1	71,5	74,5	3	4
		71,5	74	2,5	3,4
	Solution P_2	71,5	74,5	3	4
		72	74	2	2,7
2e préparation	Solution P_3	76	78,5	2,5	3
		75,5	79	3,5	4,5
	Solution P_4	75,5	78	2,5	3
		76	78	2	2,5

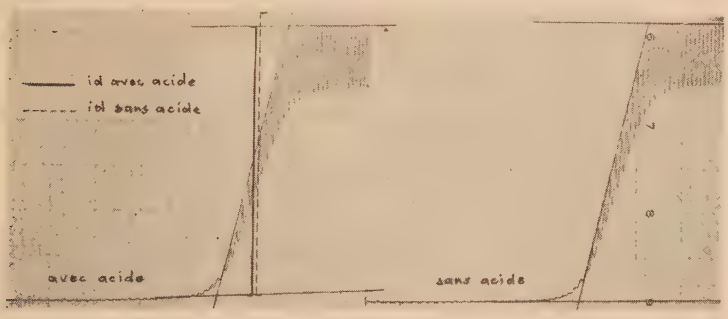


Figure 20. — Acide tripolyphosphorique.

d) *Acides polyphosphoriques* : Comme pour l'acide tripolyphosphorique, nous réalisons deux préparations différentes selon la technique de la page 25.

On obtient avec la première préparation les solutions P_1, P_2 et leurs témoins, avec la deuxième préparation, les solutions P_3, P_4 et leurs témoins. On trace alors le même nombre de courbes que pour l'acide tripolyphosphorique. Les résultats sont les suivants :

		i_d Sol. "P" mm	i_d Témoin mm	Différence	% ion Na disparu
Première préparation	Solution P_1	63	74,5	11,5	15,5
		62,5	74	11,5	15,5
	Solution P_2	62	72,5	10,5	14,5
		62	73	11	15
Deuxième préparation	Solution P_3	62,5	73	10,5	14,5
		63	73	10	14
	Solution P_4	62	72	10	14
		62	71	9	12,5

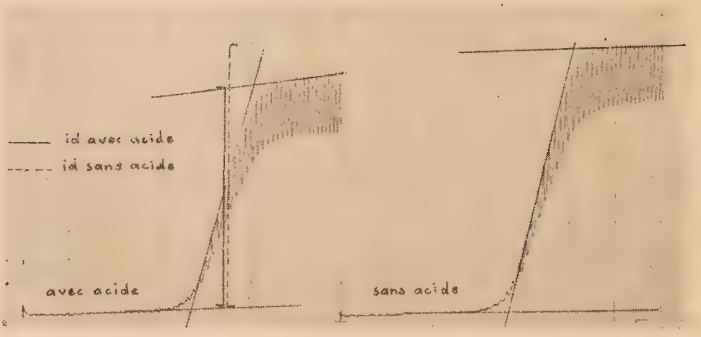


Figure 21. — Acides polyphosphoriques.

e) *Acide trimétaphosphorique :* Nous opérons ici encore avec deux préparations différentes d'acide trimétaphosphorique synthétisé selon la technique de la page 25. Si nous rappelons ici que, du fait de la solubilité relativement faible du trimétaphosphate de sodium, les solutions obtenues sont très diluées, on comprend que dans ce cas, nous ne pouvons réaliser avec la première préparation qu'une solution P_1 et avec la deuxième qu'une solution P_3. On obtient ainsi les résultats suivants :

	i_d Solution "P" mm	i_d Témoin mm	Différence	% ion Na disparu
1re préparation	75,5	75,5	0	0
Solution P_1	75,5	76	0,5	$\simeq$ 0
2e préparation	74,5	75	0,5	$\simeq$ 0
Solution P_3	74,5	74,5	0	0

Figure 22. — Acide trimétaphosphorique.

f) *Cocarboxylase :* Nous réalisons une solution mère de cocarboxylase Roche $\frac{M}{8}$ environ. A partir d'elle, nous préparons les solutions P_1, P_2.

24 heures après, nous repréparons une solution mère identique qui nous conduit aux solutions P_3, P_4. Les résultats sont les suivants :

		i_d Sol. "P" mm	i_d Témoin mm	Différence	% ion Na disparu
Première solution mère	Solution P_1	70	72	2	2,8
		70	72	2	2,8
	Solution P_2	71	72	1	1,4
		72	72,5	0,5	0,7
Deuxième solution mère	Solution P_3	73	75	2	2,6
		73	75,5	2,5	3,3
	Solution P_4	73	75	2	2,6
		73	75	2	2,6

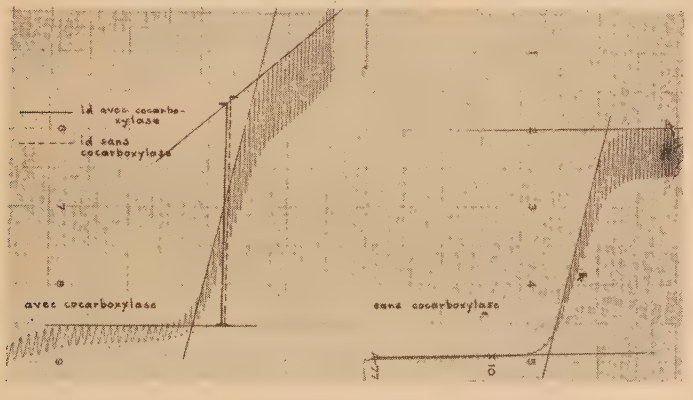


Figure 23. — Cocarboxylase.

g) *ATP :* Nous préparons à 24 heures d'intervalle, deux solutions d'acide adénosine triphosphorique selon la technique exposée page 26. On obtient ainsi les quatre solutions P_1, P_2, P_3, P_4 et leurs témoins, avec lesquelles nous traçons comme d'habitude les 16 courbes qui nous donnent les résultats indiqués dans le tableau ci-après :

		i_d Sol. "P" mm	i_d Témoin mm	Différence	% ion Na disparu
1re préparation	Solution P_1	69,5	72,5	3	4
		69,5	72,5	3	4
	Solution P_2	70,5	72,5	2	2,8
		70,5	72,5	2	2,8
2e préparation	Solution P_3	70	72,5	2,5	3,5
		70	72,5	2,5	3,5
	Solution P_4	70,5	72,5	2	2,8
		70	72,5	2,5	3,5

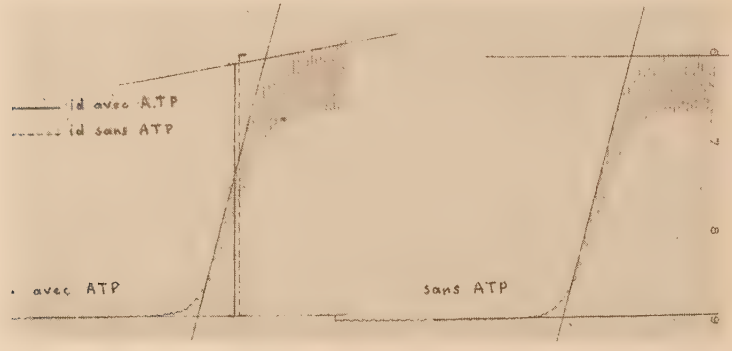


Figure 24. — ATP.

Nous contrôlons évidemment que l'acide adénosine triphosphorique que nous utilisons a été totalement débarrassé de sodium par la résine.

Pour ce faire, nous prélevons 3 cm³ de cette solution, nous la neutralisons jusqu'à pH 7,1 avec de l'hydroxyde de tétraméthylammonium dilué au 1/2 et nous portons le tout à 50 cm³, puis nous réalisons un polarogramme avec le mélange suivant qui contient la même quantité d'adénosine triphosphorique que les solutions « P » ci-dessus :

à 1 cm³ de dilution, nous ajoutons 4 cm³ d'isopropanol et 5 cm³ d'iodure de tétraméthylammonium $\frac{M}{5}$ (Figure 25).

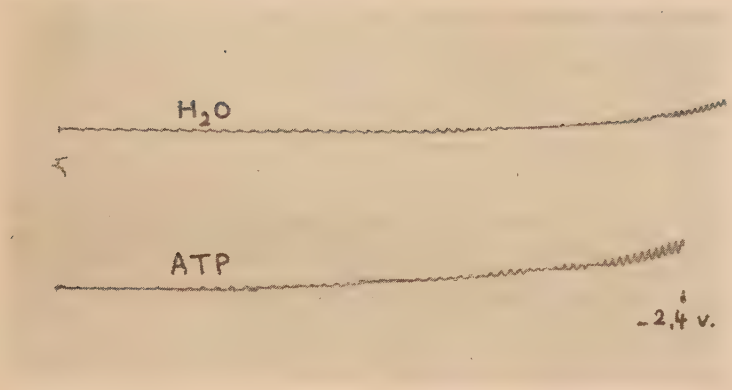


Figure 25. — Contrôle de l'élimination du sodium après passage sur résine.

La courbe nous montre que nous n'enregistrons qu'un courant résiduel.

h) *E.A.P.P. ;* Avec les E.A.P.P., nous avons réalisé un plus grand nombre d'expériences. Nous avons effectué, selon la technique décrite page 26, huit synthèses.

Avec la liqueur acide, issue de chacune de ces préparations, nous avons préparé les solutions P_1, P_2 ainsi que leurs témoins respectifs et tracé les courbes suivantes en répétant chaque expérience :

Première expérience :

Solution P_1 et témoin puis Solution P_2 et témoin

Deuxième expérience :

Solution P_1 et témoin puis Solution P_2 et témoin

Nous avons obtenus les résultats suivants :

	Solution P_1	Nombre atomes phosphore fixés sur 1 molécule de thiamine	i_d Solution "P" mm (avec E.A.P.P.)	i_d Témoin mm (sans E.A.P.P.)	Différence	% ion Na disparu
1re synthèse		9	70	78	8	10
			70,5	79	8,5	10,5
	Solution P_2		74	Produit hydrolysé		
			74			
2e synthèse	Solution P_1	8	71	78	7	9
			71	78	7	9
	Solution P_2		71	77,5	6,5	8,5
			71	78	7	9
3e synthèse	Solution P_1	8	66	74	8	10,5
			67,5	75	7,5	10
	Solution P_2		67,5	74	7,5	10
			67	75	8	10,5
4e synthèse	Solution P_1	7	71,5	77	5,5	7
			71,5	78	7,5	9,5
	Solution P_2		72	78	6	8
			71,5	77	5,5	7
5e synthèse	Solution P_1	10	68	76	8	10,5
6e synthèse	Solution P_1	11	68	77	9	11,5
			66	74	8	10,8
7e synthèse	Solution P_1	9	85	95	10	10,5
			85	95	10	10,5
8e synthèse	Solution P_1	8	77,5	86	8,5	9,9
			76,5	85	8,5	10

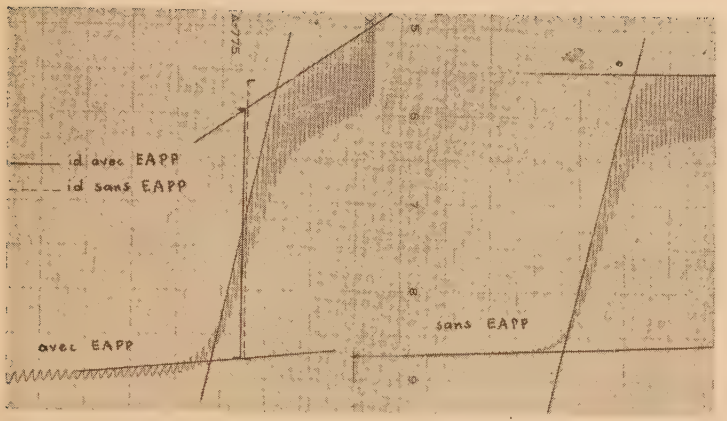


Figure 26. — E.A.P.P..

N.B. — Les courbes tracées pour les 7e et 8e synthèses l'ont été avec des tubes capillaires différents.

Nous donnons maintenant un tableau résumé des résultats que nous venons d'exposer. Nous indiquons les écarts moyens enregistrés pour chaque acide.

Acide étudié	Pourcentage moyen de sodium disparu
Orthophosphorique	0
Pyrophosphorique	0
Tripolyphosphorique	3,4
Polyphosphoriques	14,5
Trimétaphosphorique	0
Cocarboxylase	2,3
ATP	3,4
E.A.P.P.	9,6

Remarque :

Pour éliminer une cause possible d'erreur, nous avons voulu vérifier que de la thiamine ajoutée à une solution de chlorure de sodium ne modifiait pas la hauteur de vague du métal.

Les solutions contenant les E.A.P.P. et que nous polarographions contiennent environ 50 μg par cm^3 de thiamine sous forme phosphorylée.

Nous avons donc réalisé selon la technique habituelle, trois séries d'enregistrements :

— Les premiers avec du NaCl $\frac{M}{250}$ pur.

— Les deuxièmes avec du NaCl $\frac{M}{250}$ additionné de thiamine à 50 µg par cm³.

— Les troisièmes avec du NaCl $\frac{M}{250}$ additionné de thiamine à 70 µg par cm³.

Les résultats sont les suivants :

NaCl pur	i_d	=	70,5 mm
NaCl additionné de 50 µg de thiamine	i_d	=	70,5 mm
NaCl additionné de 70 µg de thiamine	i_d	=	70,5 mm

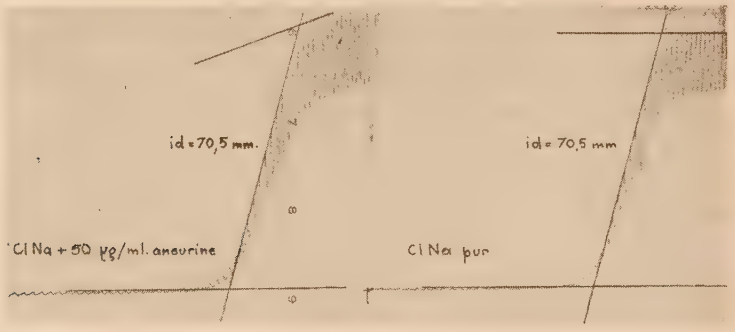


Figure 27. — Addition de Thiamine à une solution de NaCl.

La présence de thiamine n'amène donc aucune modification à la hauteur de vague du sodium. On remarque bien entendu sur la figure les déformations du tracé polarographique provoquées par l'addition de la molécule de thiamine. Mais on remarque également que la hauteur de vague déterminée graphiquement selon la méthode classique indiquée page 67 est la même, quelle que soit l'importance de la déformation.

Résultats obtenus avec le potassium

Comme nous l'avons déjà précédemment rapporté, les mesures effectuées avec le potassium ont été conduites rigoureusement de la même manière mais en utilisant ici une solution de $K_2 CO_3$ $\frac{M}{10}$.

Avec chaque acide, nous avons préparé les solutions « P » et nous avons tracé les polarogrammes comme pour le sodium.

a) *Acide orthophosphorique*

	i_d Solut. "P" mm	i_d Témoin mm	Différence	% ion K disparu
Solution P_1	83	83	0	0
	82,5	83	0,5	0
Solution P_2	83,5	82	0	0
	83,5	82	0	0

b) *Acide pyrophosphorique*

	i_d Solut. "P" mm	i_d Témoin mm	Différence	% ion K disparu
Solution P_1	81,5	82,5	1	$\simeq$ 0
	82,5	83	0,5	$\simeq$ 0
Solution P_2	82,5	83	0,5	$\simeq$ 0
	82,5	83	0,5	$\simeq$ 0

c) *Acide tripolyphosphorique*

		i_d Sol. "P" mm	i_d Témoin mm	Différence	% ion K disparu
1re préparation	Solution P_1	80	82	2	2,5
		81,5	81,5	0	0
	Solution P_2	79	82	3	3,5
		79,5	82,5	3	3,5
2e préparation	Solution P_3	79,5	81	1,5	1,8
		79,5	81	1,5	1,8
	Solution P_4	79,5	81,5	2	2,5
		79,5	81,5	2	2,5

d) *Acides polyphosphoriques*

		i_d Sol. "P" mm	i_d Témoin mm	Différence	% ion K disparu
1re préparation	Solution P_1	69	80	11	13,5
		69	80,5	11,5	14
2e préparation	Solution P_3	65	75	10	13,5
		67	77	10	13

e) *Acide trimétaphosphorique*

		i_d Sol. "P" mm	i_d Témoin mm	Différence	% ion K disparu
1re préparation	Solution P_1	80	80	0	0
		81	80	0	0
	Solution P_2	80	80	0	0
		80	80	0	0
2e préparation	Solution P_3	76,5	76	0	0
		78,5	77	0	0
	Solution P_1	79	79,5	0	0
		80	79,5	0	0

f) *Cocarboxylase*

		i_d Sol. "P" mm	i_d Témoin mm	Différence	% ion K disparu
1re solution mère	Solution P_1	81	82,5	1,5	1,8
		83	81,5	0	0
	Solution P_2	84,5	84,5	0	0
		84,5	84,5	0	0
2e solution mère	Solution P_3	77,5	79,5	2	2,5
		78,5	78,5	0	0
	Solution P_4	77	78,5	1,5	1,9
		77	78,5	1,5	1,9

g) *ATP*

		i_d Sol. "P" mm	i_d Témoin mm	Différence	% ion K disparu
1re préparation	Solution P_1	79,5	82,5	3	3,6
		79,5	82,5	3	3,6
	Solution P_2	79,5	82,5	3	3,6
		79	82	3	3,7
2e préparation	Solution P_3	79	82	3	3,7
		79	81,5	2,5	3
	Solution P_4	79,5	82	2,5	3
		79,5	82	2,5	3

Comme dans le cas du sodium, nous faisons un polarogramme à blanc avec la solution d'acide adénosine triphosphorique pour nous assurer que tout le sodium a bien été échangé par la résine.

h) *E.A.P.P.*

		Nombre atomes phosphore fixés sur 1 molécule de thiamine	i_d Solution "P" mm	i_d Témoin mm	Différence	% ion K disparu
1re synthèse	Solution P_1	10	78	82	4	4,8
			77,5	82	4,5	5,5
	Solution P_2		77	82	5	6
			77	81,5	4,5	5,5
2e synthèse	Solution P_1	11	77	82	5	6
			77	82,5	5,5	6,7
	Solution P_2		76	82	6	7,3
			77	82	5	6
3e synthèse	Solution P_1	9	93,5	100	6,5	6,5
			93,5	99	5,5	5,5
	Solution P_2		93,5	100	6,5	6,5
			93,5	100	6,5	6,5
4e synthèse	Solution P_1	8	89,5	94,5	5	5,3
			89	95	6	6,3
	Solution P_2		91,5	97,5	6	6
			90	96	6	6,2

N. B. — Les courbes tracées pour les 3e et 4e synthèses l'ont été avec des tubes capillaires différents.

Nous donnons maintenant un tableau résumant tous ces résultats. Nous indiquons seulement les écarts moyens enregistrés. Nous répétons également le tableau résumé du sodium de la p. 87. Ainsi, nous pourrons mieux comparer les phénomènes observés avec les deux cations Na^+ et K^+.

Acide utilisé	Pourcentage moyen de sodium disparu	Pourcentage moyen de potassium disparu
Orthophosphorique	0	0
Pyrophosphorique	0	0
Tripolyphosphorique	3,4	2,2
Polyphosphoriques	14,5	13,5
Trimétaphosphorique	0	0
Cocarboxylase	2,3	1
A T P	3,4	3,4
EAPP	9,6	6

L'examen de ce tableau nous montre que l'addition d'un acide polyphosphorique à une solution contenant des ions sodium ou potassium fait disparaître une partie de ceux-ci. En outre, on peut noter deux faits :

— la disparition est d'autant plus importante que la chaîne polyphosphorique est plus longue,

— les plus grands écarts obtenus le sont avec les E.A.P.P. et les acides polyphosphoriques dérivés du sel de Graham.

§ V. — EXPERIMENTATION COMPLEMENTAIRE SUR LA DISSIMULATION DU SODIUM PAR LES E.A.P.P.

Les résultats que nous apportons semblent déjà probants en eux-mêmes. Mais il était évidemment satisfaisant d'apporter une nouvelle preuve de cette disparition d'ions sodium. Pour cela, nous avons pris le problème à rebours en nous laissant guider par l'idée suivante : si du sodium mis en présence d'un acide polyphosphorique disparaît en partie sous forme ionique, on doit pouvoir le faire réapparaître sous cette même forme en détruisant la molécule d'acide polyphosphorique.

C'est ainsi que si nous polarographions une solution de sel de sodium d'E.A.P.P. séparé par fractionnement à l'acétone (p. 28), elle donnera une vague de sodium d'amplitude i_d. Si maintenant nous détruisons les E.A.P.P. contenus dans cette solution et que nous retraçons un polarogramme, le sodium libéré sous forme ionique par cette destruction, accroîtra le courant de diffusion enregistré i_{dm} qui sera plus important que i_d.

Il convenait de trouver une méthode permettant de détruire les E.A.P.P. sans introduire dans la solution des substances susceptibles de modifier les enregistrements polarographiques. Pour cela, nous avons simplement adopté la méthode de minéralisation décrite par KOLTHOFF (44) pour le dosage du sodium dans les matières organiques.

Nous avons alors polarographié une solution de sel de sodium d'E.A.P.P. séparé par fractionnement à l'acétone, puis minéralisé cette solution et enfin, réalisé un nouvel enregistrement. La différence entre les deux courants de diffusion nous fournit la quantité d'ions sodium que les E.A.P.P. « dissimulaient ».

Nous avons adopté le protocole expérimental suivant : 20 cm^3 d'une solution de C_0 ou de C_1 contenant environ 4.000 $\mu g/cm^3$ de phosphore sont portés à pH 7,15 avec une solution de $Na_2 CO_3$. Nous prélevons alors 5 cm^3 exactement que nous portons dans un creuset de quartz. On évapore très lentement la solution pour éviter les pertes par projection puis, quand l'évaporation est terminée, on enflamme le résidu. On couvre alors le creuset et on porte au four à moufle 1 h. 30 à 650-700°.

Au bout de ce temps, le creuset une fois refroidi est rempli d'eau tiède et on laisse en contact pendant 15 minutes en agitant fréquemment. On laisse à nouveau refroidir et on porte sans perte à 50 cm^3.

Un polarogramme est alors effectué sur la sensibilité Id 20 avec la solution suivante : à 2 cm^3 de solution minéralisée sont ajoutés 8 cm^3 d'isopropanol, puis 5 cm^3 de solution d'iodure de tétraméthylammonium $\frac{M}{5}$.

On obtient un courant de diffusion i_{dm}. Le témoin est effectué de la manière suivante : 5 cm^3 exactement mesurés de la solution de C_0 ou de C_1 à pH 7,15 sont portés à 50 cm^3. On effectue un enregistrement sur la sensibilité Id 20 avec la solution ci-dessous : à 2 cm^3 de dilution sont ajoutés 8 cm^3 d'isopropanol, puis 5 cm^3 de solution d'iodure.

On obtient ainsi un courant de diffusion de valeur i_d. Ce type d'expérience est réalisé deux fois avec chaque C_0 ou C_1. Les résultats obtenus sont portés dans le tableau ci-après :

	Longueur de la chaîne phosphorique		i_{dm} mm	i_d mm	Différence	% Na^+ apparu
1re synthèse C_9	9	1re expérience	57	50	7	12,5
		2e experience	57	50	7	12,5
2e synthèse C_9	9	1re expérience	55	63,5	8,5	13,5
			55,5	64	8,5	13,5
		2e expérience	56,5	63,5	7	11
			56,5	64	7,5	12
2e synthèse C_1	6	1re expérience	57	64	7	10,9
			57	63,5	6,5	10,2
		2e expérience	58	64	6	9,4
			57,5	64	6,5	10,1
3e synthèse C_8	8	1re expérience	54,5	61,5	7	11,5
			54	62	8	13
		2e expérience	59	68	9	13
			59	67	8	12
3e synthèse C_1	6	1re expérience	52,5	58,5	6	10
			52	58,5	6,5	11

L'examen de ce tableau montre deux faits :

a) La dissimulation du sodium est directement liée à la longueur de la chaîne phosphorique, ce qui confirme les résultats précédents.

b) La dissimulation observée est plus importante que lors des expériences réalisées avec la liqueur acide. Ce fait ne doit pas nous surprendre car nous l'avons déjà dit, cette liqueur n'est qu'un mélange, alors qu'ici nous avons utilisé des E.A.P.P. purifiés.

Ces résultats ne pouvaient prendre toute leur valeur que si nous administrions la preuve que la succession des opérations de minéralisation n'apportait pas de sodium à nos solutions. Pour éliminer cette objection nous avons procédé ainsi : 5 cm³ de solution de NaCl $\frac{M}{5}$ sont évaporés, portés au four et le résidu dissous est porté à 50 cm³ exactement de la même manière que pour les E.A.P.P.

Nous traçons un polarogramme sur la sensibilité Id 20 avec la solution suivante : à 2 cm³ de solution minéralisée on ajoute 8 cm³ d'isopropanol puis 5 cm³ de solution d'iodure.

Puis nous préparons un témoin de la manière suivante : 5 cm³ de solution de NaCl $\frac{M}{5}$ sont portés exactement à 50 cm³ et on trace un enregistrement sur Id 20 avec la solution suivante : à 2 cm³ de dilution on ajoute 8 cm³ d'isopropanol puis 5 cm³ de solution d'iodure.

Théoriquement, les courants de diffusion obtenus dans ces deux séries d'expériences devraient être identiques, en fait les résultats sont ceux indiqués dans le tableau ci-dessous :

	i_d Solution pure mm	i Solution portée au four mm	Perte %
Première expérience	85	81,5	4
	86	83	3,5
Deuxième expérience	74	71	4
	74,5	71	4,5
Troisième expérience	71	68	4
	71	68	4

L'examen de ce tableau nous montre que la succession des opérations de minéralisation s'accompagne d'une légère perte en sodium.

Ce fait joue en notre faveur puisqu'il vient diminuer le courant de diffusion des solutions de C_0 ou de C_1 minéralisées.

Les pourcentages donnés p. 94 sont donc des valeurs minima.

DISCUSSION

Nous nous proposons de discuter les résultats que nous avons obtenus avec les deux méthodes pHmétrique et polarographique. Ils nous ont permis, pensons-nous, de reconnaître l'état de dissociation des sels de Na^+ et K^+ des E.A.P.P., comparativement à quelques composés polyphosphoriques minéraux et organiques. Avec la méthode titrimétrique, nos résultats établissent que la solution d'E.A.P.P. salifiée à pH 7,5 environ s'acidifie par simple addition d'ions Na^+ ou K^+. Ce résultat semble indiquer une dissociation plus grande des hydrogènes des acidités faibles en présence d'ions sodium ou potassium. Il convient, en effet, de remarquer que les teneurs salines que nous réalisons sont de l'ordre de $\frac{M}{6}$ en ions Na^+ ou K^+. Ainsi donc pour la même solution d'acides polyphosphoriques, à quantité égale d'hydroxyde de tétraméthylammonium ajouté, la solution additionnée de NaCl ou de KCl est plus acide que la solution pure. Cet écart de pH est d'autant plus grand que la chaîne polyphosphorique est plus longue, ainsi qu'il apparaît à l'examen des tableaux et courbes obtenus avec les divers composés polyphosphoriques étudiés. Les plus grands écarts obtenus avec les acides polyphosphoriques minéraux et les E.A.P.P. sont de l'ordre de l'unité de pH.

L'utilisation de la technique polarographique nous a tout d'abord permis de retrouver tous les résultats que nous avions mis en évidence par la technique titrimétrique. Tout d'abord, après nous être entourés de toutes les précautions expérimentales qui doivent être prises dans la polarographie d'un cation alcalin, nous avons bien contrôlé que dans les conditions où nous opérions, la relation d'Ilkovic était bien vérifiée : nous retrouvions systématiquement une proportionnalité entre la hauteur de vague et la concentration en ions alcalins.

Les résultats obtenus qui sont portés dans les tableaux de la p. 78 à la p. 91 établissent une diminution de la hauteur de vague fournie par les solutions d'ions alcalins lorsqu'on les additionne d'un composé polyphosphorique, toutes choses étant égales par ailleurs.

Dans une technique d'application aussi délicate pour les cations se déchargeant à des potentiels très négatifs, une contre-épreuve était indispensable. Nous pensons en avoir apporté une avec les expériences de minéralisation décrites p. 93. Du sodium est manifestement libéré sous forme ionique après minéralisation de la molécule d'E.A.P.P. Il semble donc que, corroborant d'ailleurs nos résultats titrimétriques, les E.A.P.P. fournissent avec les cations alcalins étudiés Na^+ et K^+ des sels partiellement indissociés

Wazer et Campanella, qui avaient étudié ces faits avec des méthodes analogues mais appliquées aux seuls acides polyphosphoriques minéraux, avaient trouvé des résultats semblables aux nôtres. Indiquons aussi que ce phénomène avait déjà été étudié au moyen d'autres techniques pour l'acide tripolyphosphorique (50). C'est la raison pour laquelle nous n'avons pas été surpris de retrouver ces propriétés en utilisant les E.A.P.P. On pouvait également prévoir que l'ion K^+ fournirait des résultats analogues à ceux présentés par l'ion Na^+.

Nous avons également retrouvé avec la technique polarographique la corrélation existant entre la dissimulation des cations alcalins et la longueur de la chaîne polyphosphorique.

Nous avons par ailleurs été amenés accessoirement à déterminer ou à vérifier les potentiels de décharge de la thiamine, de la cocarboxylase et des E.A.P.P., bien que cette étude ne soit en aucune façon liée à l'objet de recherche que nous nous sommes proposés.

Nous avons trouvé dans nos conditions opératoires deux vagues pour la thiamine à — 1,3 volts et — 1,6 volts ; une vague pour la cocarboxylase à — 1,55 volts et, enfin, pour les E.A.P.P. une vague bien définie à —1,55 volts et une autre plus difficilement interprétable à — 1,85 volts.

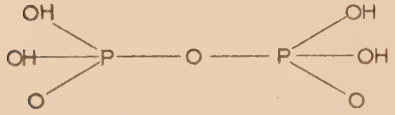
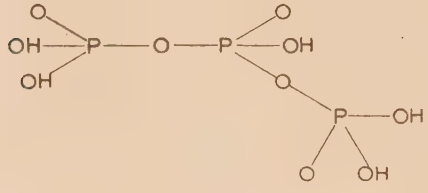
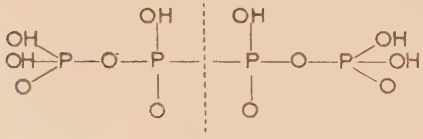
CONCLUSIONS

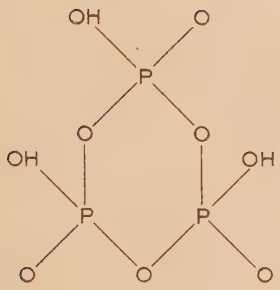
I. — Les acides polyphosphoriques minéraux et organiques semblent posséder un pouvoir de dissimulation vis-à-vis des cations alcalins.

II. — Ce phénomène est maximum avec les E.A.P.P. et les acides polyphosphoriques minéraux dérivés du sel de Graham.

III. — Les molécules de Cocarboxylase et d'E.A.P.P. ont des potentiels de demi-palier différents de celui de la thiamine.

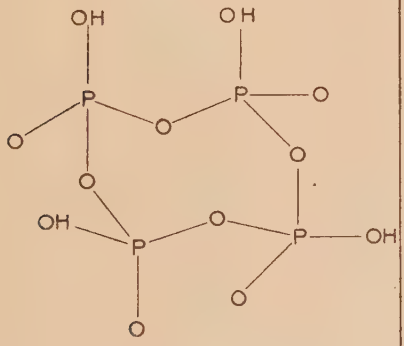
FORMULAIRE

	Acide PYROPHOSPHORIQUE
	Acide TRIPOLYPHOSPHORIQUE
	Acide POLYPHOSPHORIQUE (Sel de GRAHAM)



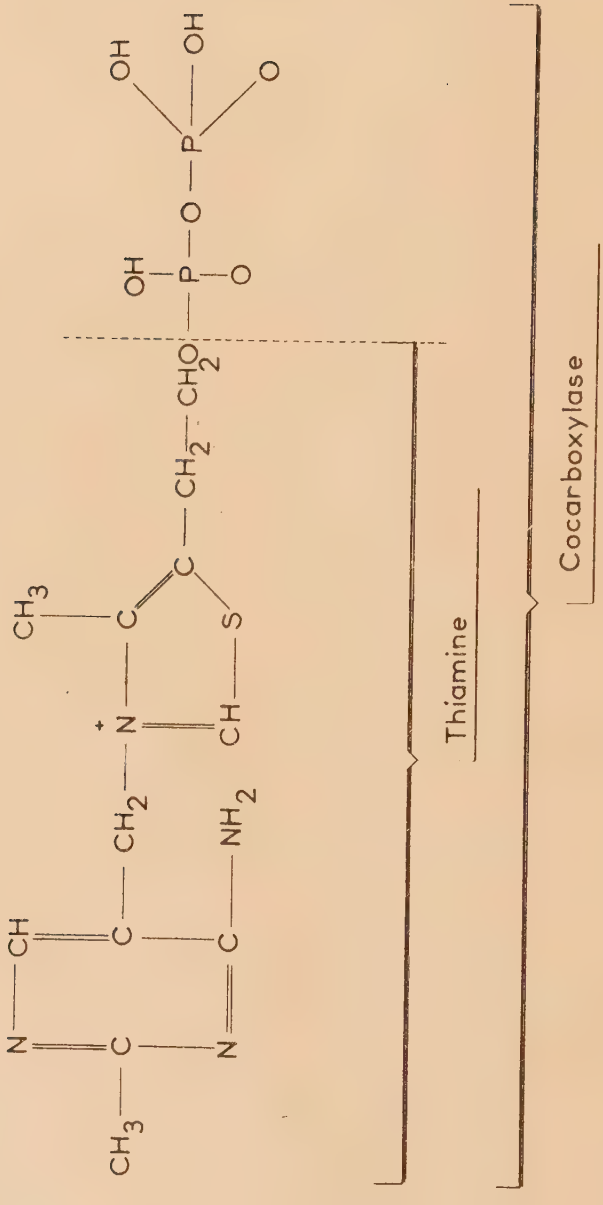
Acide

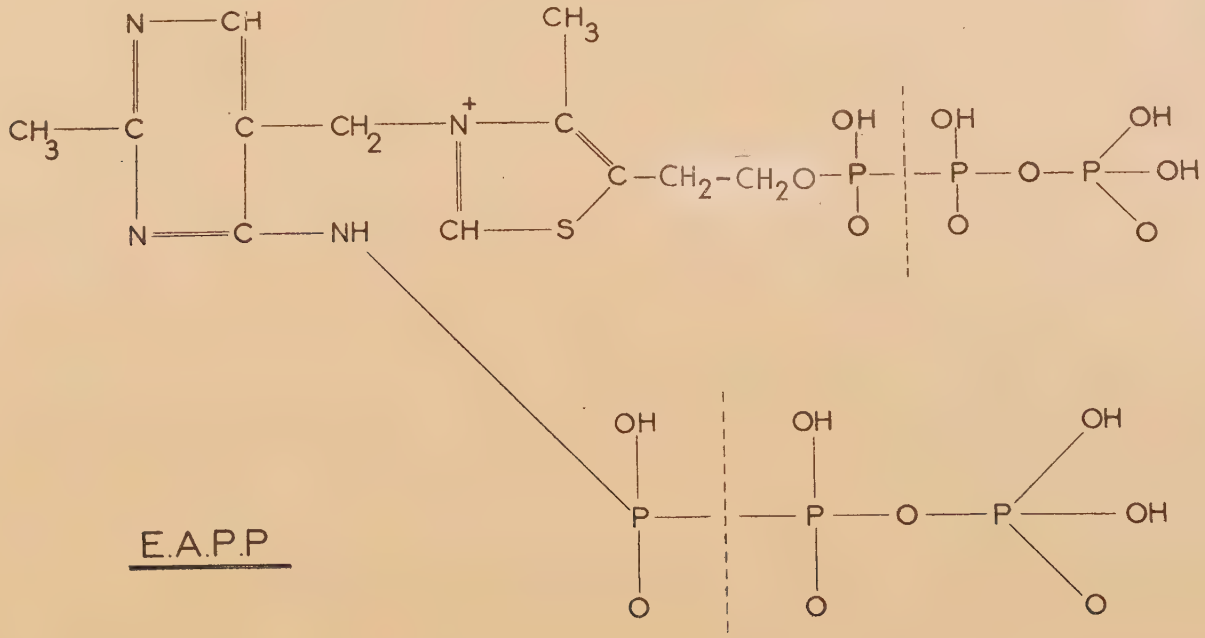
TRIMETAPHOSPHORIQUE



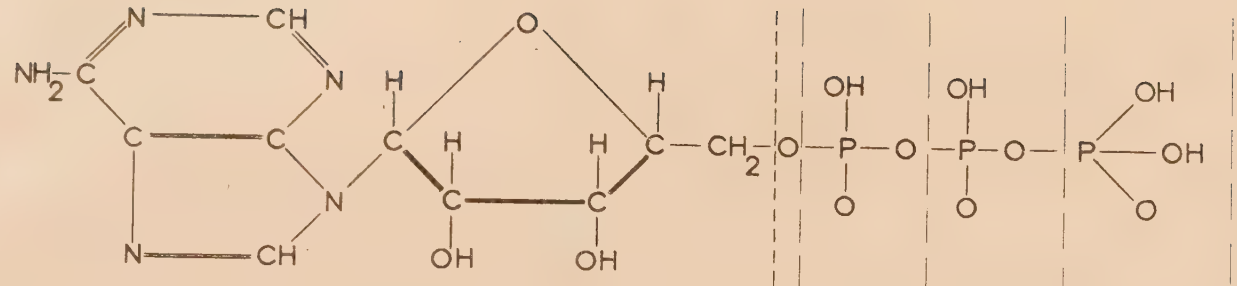
Acide

TETRAMETAPHOSPHORIQUE


Thiamine
Cocarboxylase


N
CH
CH3
CH3
C
C
CH2
N+
C
OH
OH
OH
C
CH2
CH2
O
P
P
O
P
OH
N
C
NH
CH
S
O
O
O
OH
OH
OH
P
P
O
P
OH
O
O
O

E.A.P.P



Adénosine

Acide Adénylique ou AMP

Acide Adénosine diphosphorique ou ADP

Acide Adénosine triphosphorique ou ATP

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. WILLIAMS R.R.
   The Vitamins Ann. Med. Assoc. Chicago 1939.

2. WILLIAMS R.R., BUCHMAN E.R. et RUEHLE A.E.
   J. Am. Chem. Soc. 1935 - *57* - 1093.
   CLINE J.K., WILLIAMS R.R. et FINKELSTEIN J.
   J. Am. Chem. Soc. 1937 - *59* - 1052.
   WILLIAMS R.R., WATERMAN R.E., KERESZTESY J. et BUCHMAN R.
   J. Am. Chem. Soc. 1935 - *57* - 536.

3. CLARKE et GURIN
   J. Am. Chem. Soc. 1935 - *57* - 1876.
   BUCHMAN E.R., WILLIAMS R.R. et KERESZTESY J.
   J. Am. Chem. Soc. 1935 - *57* - 1849.

4. RUEHLE A.E.
   J. Am. Chem. Soc. 1935 - *57* - 1887.
   WILLIAMS R.R. et RUEHLE A.E.
   J. Am. Chem. Soc. 1935 - *57* - 1856.
   WILLIAMS R.R. et SOIES T.D.
   Vitamin B_1, N. Y. 1938.

5. LOHMAN K. et SCHUSTER P.
   Naturwis 1937 - *25* - 26.
   Biochem. Z. 1937 - *294* - 188.

6. ROUX H.
   Bull. Soc. Chim. Biol. 1942 - *24* - 1209.

7. ROUX H., TEYSSEIRE Y., DUCHESNE G.
   C. R. VIII[e] Congrès de Chim. Biol., Paris octobre 1948.

8. ROUX H., JACQUET-FRANCILLON M.L. et CREVAT A.
   Bull. Soc. Chim. Biol. 1957 - *39* - 313.

9. ROUX H., COUZINIE A.
   Experientia 1954 - *10* - 168.

10. ROUX H., THILO E., GRUNZE U.H. et VISCONTINI M.
    Helvetica Chemica Acta 1955 - *38* - 15.

11. GRUNZE H. et THILO E.
    Sitzungsber. Deutsch. Akad. Wiss. Berlin N° 5 (1954).

12. EBEL *J.*
    Thèse de Sciences Physiques, Strasbourg, Nov. 1951.

13. VISCONTINI M. et EHRHARDT
    Sonderdruck aus I.U.P.A.C., Colloquium Münster/Westf., 2-6 sept. 1954.

14. Forrest H.S. et Todd A.R.
J. Chem. Soc. 1950 - 3295.

15. Viscontini M. et Bonetti
Helv. Chem. Acta 1951 - *34* - 2435.

16. Roux H., Teysseire Y. et Duchesne G.
C.R. Soc. Biol. 1948 - *142* - 368.

17. Roux H., Teysseire Y. et Duchesne G.
C.R. Soc. Biol. 1948 - *142* - 370.

18. Roux H., Teysseire Y. et Duchesne G.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1948 - *30* - 592.

19. Roux H., Teysseire Y. et Duchesne G.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1948 - *30* - 600.

20. Beren-Blum et Chain
Biochem. J. 1938 - *32* - 295.

21. Roux H., Francillon M.L. et Couzinie A.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1954 - *36* - 386.

22. Roux H. et Callandre A.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1950 - *32* - 793.

23. Roux H. et Callandre A.
Experientia 1950 - *6* - 386.

24. Roux H., Teysseire Y. et Callandre A.
Congrès Chim. Biol. Cambridge 1949 - Abstarct 20 396/1 sect. 1 p. 57.

25. Roux H. et Callandre A.
Experientia 1952 - *8* - 114.

26. Roux H., Jacquet-Francillon M.-L. et Crevat A.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1955 - *37* - 1147.

27. Roux H., Jacquet-Francillon M.-L. et Crevat A.
Congrès, Bioch. Bruxelles 1955 - *30* - (4 - 27).

28. Roux H., et Jacquet-Francillon M.-L.
Congrès Biochimie Bruxelles 1955 p. 42 (5 - 13).

29. Roux H., Denan M. et Francillon M.-L.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1951 - *33* - 1152.

30. Roux H. et Francillon M.-L.
Congrès Chim. Biol. Paris 1952.
Résumé des communications p. 441.

31. Behrens B. et Seelkopf K.
Arch. Für. Exper. Path. und Pharmak. 1933 - *169* - 238

32. Buchtal F. et Kahlson G.
Acta. Physiol. Scand. 1944 - *8* - 318.

33. Minz B.
C.R. Soc. Biol. 1939 - *131* - 1156.

34. Von Muralt A.
Nature 1943 - *152* - 188.

35. Roux H., Francillon M.-L.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1954 - *36* - 993.

36. Roux H., Jacquet-Francillon M.-L. et Rinaldi R.
Jour. de Physio. 1958 - *50* - 497, 500.

37. Roux H., et Jacquet-Francillon M.-L.
XXVII[e] Réunion des Physiologistes de langue française, Juin 1959, Jour. de Physio. 1959 - *51* - 561.

38. Ussing H.
Symp. III 4[e] Congrès Inter. Bioch. Vienne 1958.

39. Van Wazer J. et Campanella D.
J. Amer. Chem. Soc. 1950 - *72* - 655.

40. Thilo E., Sonntag A. et Rattorg K.
Z. Anorg. allg. Chem. 1956 - *283* - 365.

41. Ebel J.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1952 - *34* - 321.

42. Audubert R. et Quentin M.
Electrochimie - Presses Universitaires de France 1942.
Audubert R.
Les ions en solutions - Presses Universitaires de France 1955.

43. Verdier E.T.
Méthode Polarographique d'électro-analyse - Hermann et C[ie] 1943.

44. Kolthoff I.M. et Lingane J.J.
Polarography - Interscience Publishers 1952. - Tome II, p. 423 à 429.

45. Lingane J.J. et Davis O.L.
J. Biol. Chem. 1941 - *137* - 567, 574.

46. Wollenberger A.
Science 1945 - Vol. CI - 386.

47. Sattori G. et Cattaneo C.
Gazz. Chim. Ital. 1944 - Vol. LXXIV - 166.

48. Zambotti V. et Ferrante A.
Bol. Soc. Ital. Biol. Sper. 1939 - Vol. XIV - 689, 690.

49. Von Muralt A.
Nature 1944 - Vol. 154 - 767.
Von Muralt A.
Pflügers Arch. ges. physiol. .1942 - *245* - 604.
Von Muralt A.
Helv. Physiol. Acta 1943 - 1 - C_{20}.

50. Frankenthal L.
J. Am. Chem. Soc. octobre 1944 - Vol. 66.

TABLE DES MATIÈRES

Pages

INTRODUCTION 11

OBJET DU TRAVAIL 23

Chapitre I. - RÉACTIFS UTILISÉS 25

Chapitre II. - TECHNIQUES UTILISÉES 29

A) Titrimétrie 29

B) Polarographie 29

§ 1. - Définition 29

§ 2. - Théorie sommaire 30

§ 3. - Cas particulier des ions alcalins 34

§ 4. - Appareillage 35

Chapitre III. - MODES OPÉRATOIRES ET RÉSULTATS OBTENUS .. 37

A) pHmétrie 37

§ 1. - Mode opératoire 37

§ 2. - Résultats obtenus 38

a) Composés minéraux 38

b) Composés organiques 45

§ 3. - Vérifications 59

B) Polarographie 62

§ 1. - Choix de l'électrolyte support 62

§ 2. - Détermination quantitative du sodium. 67

§ 3. - Vague donnée par la thiamine 69

a) thiamine 70

b) cocarboxylase 73

c) E.A.P.P. 74

§ 4. - Disparition du sodium 77

I. - Mode opératoire 77

II. - Résultats obtenus 78

— avec le sodium 78

— avec le potassium 88

§ 5. - Expérimentation complémentaire 92

DISCUSSION 97

CONCLUSIONS 99

FORMULAIRE 100

BIBLIOGRAPHIE 105

Deuxième Thèse

PROPOSITIONS DONNEES PAR LA FACULTE :

Etude par spectrophotométrie infra-rouge de quelques Polyphosphates.

Vu et permis d'imprimer.

Le Recteur de l'Académie d'Aix-Marseille :
J. BLACHE.

Aix-en-Provence, le 24 Mai 1961.